

마우스의 비장에 미치는 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene의 면역병리학적 연구

이덕윤 · 한상섭* · 이상목

건국대학교 축산대학 수의학과
*한국화학연구소 안전성연구센터

IMMUNOPATHOLOGY OF SPLEEN FOLLOWING 7,12-DIMETHYLBENZ[a]ANTHRACENE TREATMENT IN BALB/C MICE

Duck Yoon Lee, Sang Seop Han* and Sang Mog Lee

Department of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University 93-1 Mojin-dong,
Seongdong-gu, Seoul 133-701, Korea

*Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O. Box 9, Daedeog Danji, Daejeon 305-606, Korea

(Received November 1, 1992)

(Accepted December 4, 1992)

ABSTRACT: This study was carried out to investigate the immunopathological effects of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) on spleen in mice. DMBA was administered subcutaneously to BALB/C mice by interscapular single injection of 50 or 100 $\mu\text{g/g}$ of body weight. Each DMBA treatment group and additional corn oil control group of mice were studied on day 1, 3, 7, 14 and 21 following the injection of DMBA. DMBA treatment resulted in marked decrease in weights and cellularity of spleen. Spleen weights showed the greatest decrease at 14 days after 50 $\mu\text{g/g}$ DMBA treatment, and at 21 days after 100 $\mu\text{g/g}$ DMBA treatment. Spleen cellularity was similarly decreased in comparison with spleen weights. Spleen showed morphologically no typical changes throughout the experiment after 50 $\mu\text{g/g}$ DMBA treatment. Following the treatment of 100 $\mu\text{g/g}$ DMBA the spleen showed severe fibrosis, hemosiderin precipitation, and megakaryocytes decrease in red pulp at 14 days, while hemopoietic function was partly restored in addition to the appearance of a few megakaryocytes at 21 days. In spleen sections treated with antibodies to IgM or Thy1.2, lymphocytes strongly stained with IgM antibody were infiltrated around the central artery within the white pulp, and T-lymphocytes of periarte-

rial lymphatic sheath (PALS) were diminished and destructed in sections treated with Thy1.2 antibody, at 14 days after the treatment of 100 $\mu\text{g/g}$ DMBA. By the electron microscopy phagocytic epithelial cells or macrophages were remarkably increased in spleen at 14 and 21 days following the treatment of 100 $\mu\text{g/g}$ DMBA.

Key Words: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene, monoclonal antibody, spleen, BALB/C mouse, immunofluorescence stain.

서 론

주위환경중에 광범위하게 산재되어 있으며 강력한 발암 가능성을 가지고 있는 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)에 속하는 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)는 세포성 면역 또는 체액성 면역기능의 억제에 중요한 영향을 미치는데(Wojdani & Alfred., 1984; Dean *et al.*, 1985, 1986; Ward *et al.*, 1986; House *et al.*, 1987; Halliday *et al.*, 1988; Thurmond *et al.*, 1988; house *et al.*, 1989; Halliday *et al.*, 1990; Burchiel *et al.*, 1990), 이러한 면역독성은 1) 임파기관의 무게 또는 조직학적 변화, 2) 임파조직, 말초 혈액 백혈구, 골수 등을 구성하는 세포들의 양적 및 질적변화, 3) 효과세포(세포독성) 또는 조절세포(협조 T세포 또는 억제 T세포) 기능의 손상, 4) 감염인자 또는 이식종양에 대한 감수성의 증가 등으로 나타날 수 있다(Dean *et al.*, 1985). DMBA 100 $\mu\text{g/g}$ 은 B6C3F1 마우스의 비장과 골수를 형성하고 있는 세포를 현저히 감소시켰으나 흉선에는 뚜렷한 변화가 없었으며 (Ward *et al.*, 1984), DMBA에 의해 형성된 골수의 형성부전과 비장내 백수의 위축 및 이에 따른 골수이형성은 DMBA의 표적세포가 다능력간세포 (pluripotent stem cell)이기 때문이며, 이러한 골수이형성은 백혈병으로 전환될 위험한 상태를 나타내게 된다(Fohlmeister *et al.*, 1982). 또한 DMBA에 의한 면역독성은, 주로 협조 T세포와 항원 제시성 대식세포의 활성을 억제함으로써 면역억제가 초래될 수 있으며(Yamashita & Hamaoka, 1982), DMBA는 B(a)P보다 강한 면역억제작용을 하고, 광범위한 B세포 억제뿐만 아니라 PYB6 Sarcoma와 *Bacterium Listeria Monocytogenes*에 대한 숙주의 감수성을 더욱 증가시키며(Ward *et al.*, 1984; Deal *et al.*, 1986), DMBA에 의한 세포독성 T세포기능의 억제는 외래성 Interleukin-2를 처리함으로써 회복되기 때문에, DMBA에 의한 세포성 면역의 표적세포는 협조 T세포임을 알 수 있다(House *et al.*, 1987). 이처럼 DMBA의 면역억제에 대한 *in vitro*에서의 연구는 활발히 이루어지고 있으나, 아직도 DMBA의 세포성면역 또는 체액성 면역의 억제에 대한 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으며, 특히 형태학적 영향에 대한 연구는 거의 되어 있지 않다. 본 연구에서는 주된 환경오염 물질중의 하나인 DMBA가 면역기관인 비장에 미치는 병리조직학적 영향을 규명하고자 마우스에 DMBA를 처리한 후 일정한 기간별로 비장을 적출하여 파라핀절편 및 동결절편을 제작하여 특수염색과 면역형광염색을 실시하였으며, 전자현미경을 사용하여 미세구조변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

한국 화학연구소의 실험동물 육종실에서 생산된 체중 20~25g되는 6~8주령의 웅성 SPF BALB/C 마우스를 분양받아 실험전 1주일 동안의 관찰을 통하여 외관상 건강하다고 인정되는 마우스만 본 실험에 이용하였으며, 실험기간 동안 급여사료는 실험동물용 사료(제일제당)를

급여하였다.

약품 및 실험설계

7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(Sigma Chemical Company, USA, Lot 19F-404)를 corn oil (Sigma Chemical Company, USA, Lot 37F-0555)에 용해시켜 체중당 50 $\mu\text{g/g}$ 또는 100 $\mu\text{g/g}$ 을 0.1 ml/되게 하여 등쪽 견갑골 사이에 1회 피하 주사하였으며, 대조군은 동량의 corn oil만을 투여하였다. 총 165수의 마우스를 corn oil만을 투여한 대조군, 체중당 50 $\mu\text{g/g}$ 또는 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA를 투여한 3군으로 구분하였으며, 시간의 경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 DMBA 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일 및 21일에 ether로 마취시킨 다음 도살하여 실험에 이용하였다. 이때 대조군과 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA 투여군은 각 기간별로 12수씩 배정하였으며, 50 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군은 각 기간별로 9수씩 공시하였다.

비장의 세포분리

Ether로 마취시켜 도살한 마우스에서 비장을 적출하여 무게를 측정하였고, 채취된 비장은 각각 10% 우혈청이 첨가된 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH 7.4)이 들어 있는 무균 배양접시에 넣은 다음, 멸균 syringe와 needle (21 gauge)을 사용하여 세포를 유리시켰다. 세포 부유액을 nylon mesh(60 μm)로 걸러서 섬유조직 덩어리를 제거시킨 후 원심분리시켰으며, 오염된 적혈구를 용해시키기 위해 0.83% NH_4Cl 과 2.06% Tris(hydroxymethyl) aminomethane의 혼합비가 9 : 1인 용액을 세포를 원침시킨 시험관에 넣어 잘 혼합한 후 실온에서 5분간 방치하여 원심분리(300 g, 5분)하였고, 상청액은 버리고 적당히 희석한 다음 혈구계산반으로 총세포수를 계산하였다.

광학 및 전자현미경 관찰

비장조직은 bouin고정액에 6~8시간 고정된 다음 탈수과정을 거쳐 파라핀포매를 하였으며, 4~6 μm 두께의 조직절편을 만들어 hematoxylin-eosin(H & E) 염색과 특수염색인 Perls' Prussian blue reaction, Masson's trichrome 염색 및 Gomori's reticulín 염색을 하였고, 미세구조 변화 관찰을 위해서는 1 mm 두께의 비장조직을 4°C 에서 1% glutaraldehyde-paraformaldehyde 고정액에 전고정한 후, 2% osmium tetroxide(OsO_4) 용액에 후고정하여 ethanol과 acetone으로 탈수하고, Epon812-araldite mixture에 포매하여 60°C 에서 중합시켰다. 포매조직은 Ultramicrotome(Reichert-Jung Ultracut E형)으로 70 nm의 두께로 초박절편을 만든 다음 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과 전자현미경(Zeiss EM109)으로 관찰하였다.

면역형광항체 반응

본 실험에 이용한 1차항체는 anti-Thy1.2(Serva사), anti-IgM(Biotech사)이며, anti-Thy1.2는 마우스에서 추출된 항체로서 R-phycoerytherin conjugate된 것을 사용하였으며, anti-IgM은 goat에서 추출된 항체를 사용하였다. Thy1.2항체는 1 : 20, IgM항체는 1 : 100으로 희석하였으며, 항원의 탐지를 위해서는 FITC-conjugated F(ab')₂ (Biotech사)를 1 : 40으로 희석하여 사용하였는데, 세정한 조직은 동결절편용 포매제인 OCT compound(Lab-Tek products, Lot: 0560108, Miles Inc. USA)에 포매한 후 즉시 동결시켰으며, 냉동절편기(Reichert Histostat, Scientific Instruments, USA)를 사용하여 4~6 μm 두께로 연속동결절편을 만든 다음, 슬라이드 접착액인 0.1 % poly-L-lysine (Sigma, Lot: 51H-4366, USA)을 처리한 유리슬라이드에 mounting하여 실온에서 충분히 건조(2~4시간)시켰다. 건조된 조직은 냉동시킨 acetone(-20°C)에 10분동안 고정한 후 실온에서 충분히 건조시켰으며, wet chamber내에서 phosphate buffer saline(이하 PBS)을 10분동안 처리한 다음 PBS를 제거하고, 비특이성 항원에 대한 면역반응을 방지하기 위하여

normal horse serum에 10분동안 반응시켰다. 그후 해당 1차항체를 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 5분간 3회 수세한 다음, Thy1.2 항원의 관찰을 위해서는 이 단계에서 Gel/Mount (Biomeda사)로 wet mounting하였으며, IgM항체의 형광발색을 위해 FITC-conjugated F(ab')₂를 37°C에서 30분동안 반응시켰다. 이어서 PBS로 5분간 3회 수세한 다음, Gel/Mount로 wet mounting하여 exciter filter(485 nm)와 barrier filter (515 nm)를 장치한 형광현미경(Olympus, PM-10ADS)으로 T세포 및 B세포들의 분포 및 변화를 관찰하였다.

결 과

비장의 무게 및 총세포수의 변화

비장의 무게는 DMBA 투여후 7일에 50 µg/g 투여군과 100 µg/g 투여군이 대조군에 대하여 각각 12.8%, 42.7%의 감소율을 나타내었으며, 14일에는 각각 47.4%, 66.7%의 감소율을 보였고, 21일에는 각각 39.1%, 69.7%의 감소율을 보였다(Table 1).

비장의 총세포수는 DMBA 투여후 3일에 50 µg/g 투여군과 100 µg/g 투여군이 대조군보다 다소 감소되었으며, 7일에는 대조군에 비하여 각각 22.4%, 43.8%의 감소율을 보였고, 14일에는 각각 46.6%, 65.1%가 감소하였으며, 21일에는 각각 39.3%, 68.0%의 감소율을 나타냈다(Table 2).

병리조직학적 변화

Prussian blue reaction, Masson's trichrome 염색 및 Gomori's reticulin 염색을 하였을 때 나타난 반응은 Table 3와 같다. 50 µg/g의 DMBA 투여군의 비장은 실험 전기간을 통하여 뚜렷한 형태학적 변화를 보이지 않았으며, 100 µg/g의 DMBA 투여군에서도 1일과 3일에 대조군과 유사한 형태를 보였으나, 14일에는 정맥동이 확장되고, 적수내에 다핵구 침윤이 현저하였으며, 세망섬유와 교원섬유가 대조군(Fig. 1 and 2)에 비하여 현저히 증가하였고(Fig. 3 and 4), 철소를 탐식한 대식세포가 뚜렷한 증가를 나타냈다(Fig. 5 and 6). 21일에도 14일과 유사한 형태를 나타냈으나, 소수의 거핵구출현과 함께 조혈기능이 일부 회복되었다.

Table 1. Spleen weights of mice following DMBA treatment (Unit: mg, Mean ± S.D.)

Groups	Days after DMBA treatment				
	1	3	7	14	21
Control	103.4 ± 4.1	111.8 ± 13.4	106.7 ± 7.4	105.4 ± 6.3	108.3 ± 12.4
DMBA(50 µg/g)	111.5 ± 8.6	97.3 ± 13.7	93.0 ± 5.9	55.4 ± 13.5*	66.0 ± 15.7*
DMBA(100 µg/g)	87.8 ± 8.8	89.2 ± 9.1	61.1 ± 8.6*	35.1 ± 9.4*	32.8 ± 10.4*

* Significantly different from controls at p < 0.05.

Table 2. Spleen cellularity of mice following DMBA treatment (Unit: Number, Mean ± S.D.)

Groups	Days after DMBA treatment				
	1	3	7	14	21
Control	1.48 ± 0.04 ^a	1.58 ± 0.15	1.53 ± 0.11	1.46 ± 0.12	1.50 ± 0.16
DMBA(50 µg/g)	1.56 ± 0.11	1.39 ± 0.17	1.25 ± 0.08	0.78 ± 0.19*	0.91 ± 0.24*
DMBA(100 µg/g)	1.24 ± 0.15	1.27 ± 0.12	0.86 ± 0.12*	0.51 ± 0.15*	0.48 ± 0.16*

^a Spleen cellularity (× 10⁸) is expressed as mononuclear cells per spleen.

* Significantly different from controls at p < 0.05.

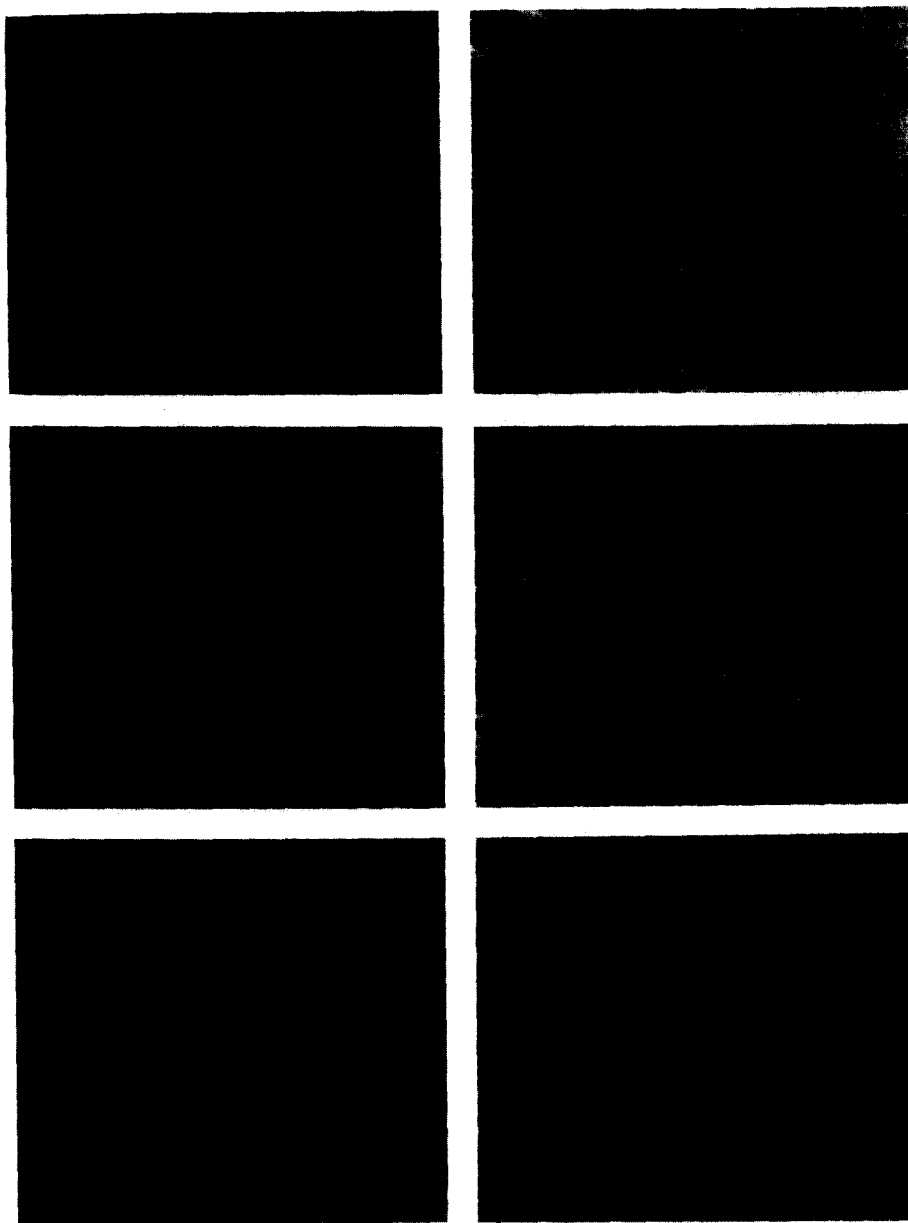


Figure 1. Spleen tissue from a control mouse. Gomori's reticulin stain. $\times 100$.

Figure 2. Spleen tissue from a control mouse. Masson's trichrome stain. $\times 100$.

Figure 3. Spleen tissue at 14 days after treatment of $100 \mu\text{g/g}$ DMBA. Note the prominent development of reticulin fiber. Gomori's reticulin stain. $\times 100$.

Figure 4. Spleen tissue at 14 days after treatment of $100 \mu\text{g/g}$ DMBA. Note the remarkable development of collagen fiber. Masson's trichrome stain. $\times 100$.

Figure 5. Spleen tissue from a control mouse. Perls' Prussian blue reaction. $\times 100$.

Figure 6. Spleen tissue at 14 days after treatment of $100 \mu\text{g/g}$ DMBA. Note the prominent precipitation of hemosiderin in the red pulp. Perls' Prussian blue reaction. $\times 200$.

Table 3. Relative expression of histochemical reactions in the spleen following DMBA treatment.

Groups	stains	Days after DMBA treatment				
		1	3	7	14	21
Control	PB	±				
	MT	+				
	GR	+				
DMBA(50 µg/g)	PB	±	±	±	++	±
	MT	+	+	+	++	++
	GR	+	+	+	++	++
DMBA(100 µg/g)	PB	±	+	++	+++	+++
	MT	+	+	++	+++	+++
	GR	+	+	++	+++	+++

Relative expression in the spleen is indicated by an arbitrary scale (± to +++), which correlates with the stained intensity of the different slides.

PB: Prussian blue reaction, MT: Masson's trichrome stain, GR: Gomori's reticulin stain.

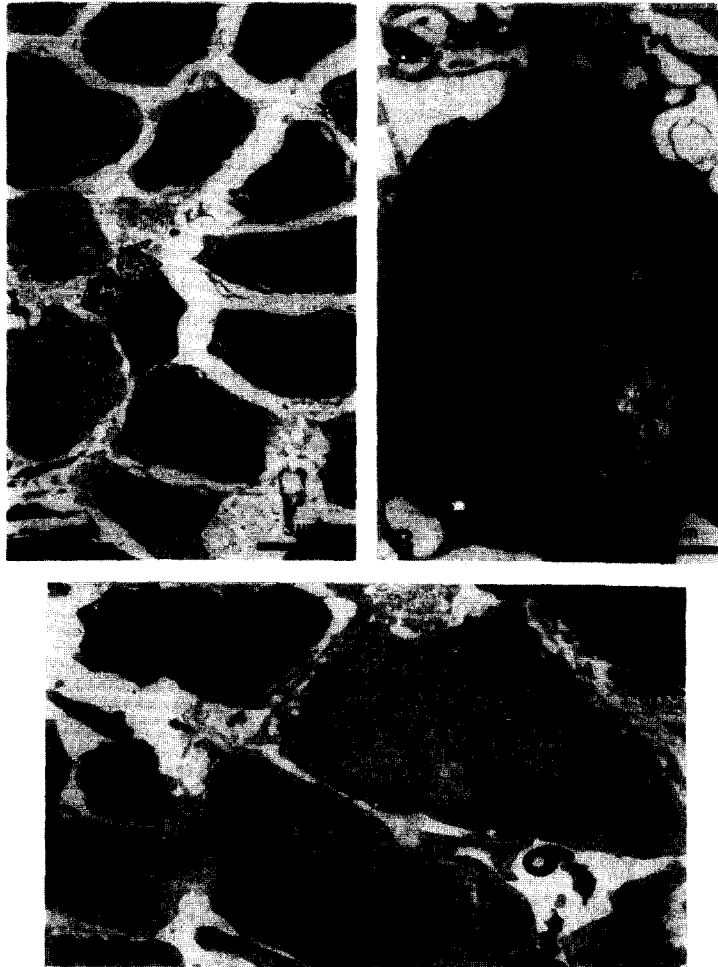


Figure 7. Electron micrograph of the control spleen.

Figure 8. Electron micrograph of the spleen at 7 days after treatment of 100 µg/g DMBA. A macrophage contains two lymphocytes in its cytoplasm.

Figure 9. Electron micrograph of the spleen at 14 days after treatment of 100 µg/g DMBA. Note the phagosomes in their cytoplasm of the two phagocytic cells.

Table 4. Distribution of megakaryocytes in spleen following DMBA treatment(Unit: Number, Mean \pm S.D.)

Groups	Days after DMBA treatment				
	1	3	7	14	21
Control	30.7 \pm 0.47	28.9 \pm 0.67	32.5 \pm 0.97	27.5 \pm 0.45	29.7 \pm 0.85
DMBA(50 μ g/g)	30.0 \pm 4.08	46.0 \pm 4.24*	14.0 \pm 9.27*	7.7 \pm 1.89*	23.7 \pm 1.89
DMBA(100 μ g/g)	23.7 \pm 3.30	54.7 \pm 7.41*	7.0 \pm 3.74*	2.3 \pm 0.47*	7.3 \pm 4.49*

Megakaryocytes were counted for all areas of cross sectioned spleen in each 5 mice in a group.

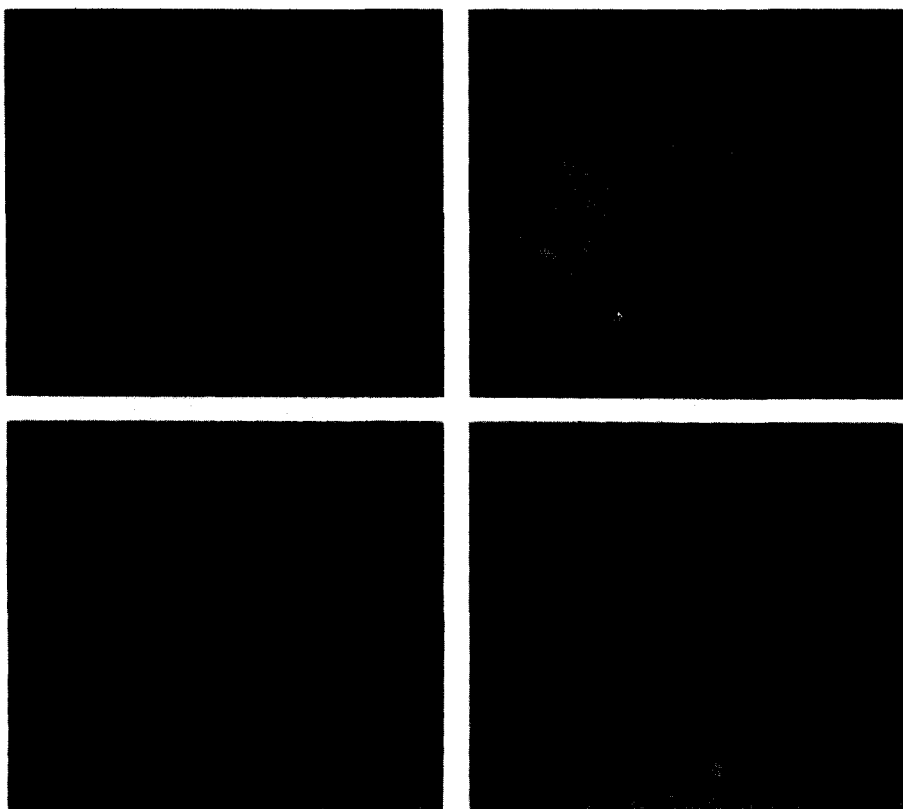
* Significantly different from controls at $p < 0.05$.

Figure 10. Immunofluorescence staining of control mouse spleen with IgM monoclonal antibody. Some cells in red pulp show bright membrane staining. $\times 200$.

Figure 11. Immunofluorescence staining of spleen with IgM monoclonal antibody at 14 days after treatment of 100 μ g/g DMBA. Note the infiltration of IgM positive cells around the central artery. $\times 400$.

Figure 12. Immunofluorescence staining of control spleen with Thy1.2 monoclonal antibody. $\times 200$.

Figure 13. Immunofluorescence staining of spleen with Thy1.2 monoclonal antibody at 14 days after treatment of 100 μ g/g DMBA. Note the destruction of T cells around the central artery. $\times 200$.

동일한 부위를 횡절단한 비장조직내의 거핵세포 관찰시에 50 μ g/g의 DMBA투여군은 3일에 대조군에 비하여 유의하게 증가되었으며, 7일과 14일에는 현저히 감소하였으나, 21일에는 다시

증가되었는데, 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군에서도 3일에는 대조군에 비하여 현저히 증가되었으며, 14일에 최대로 감소하였다(Table 4).

50 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군의 비장은 광학현미경으로 관찰하였을 때 실험 전기간을 통하여 조직학적 변화가 뚜렷하지 않았으므로 전자현미경 관찰은 하지 않았다. 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군은 3일에 백수내의 임파구들은 대조군(Fig. 7)과 유사한 형태를 나타냈으나 적수내에서는 탐식작용을 보이는 소수의 대식세포가 관찰되었으며, 7일에 적수내에서는 많은 적혈구들이 파괴되었고 이를 탐식한 대식세포도 상당히 증가하였으며(Fig. 8), 14일에는 백수내의 다수의 임파구들이 괴사 및 파괴되었고, 적수내의 적혈구들도 다수가 파괴되었으며 이러한 세포를 탐식한 대식세포가 현저히 증가되었다(Fig. 9). 21일에도 14일과 유사한 형태를 나타냈다.

면역형광항체 반응

100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군은 대조군(Fig. 10)에 비하여 3일에 적수내에서 IgM항체에 강한 양성반응을 보이는 세포들이 증가되었고, 14일에는 T세포로 구성된 동맥주위임파구초내에 IgM양성반응을 보이는 세포들이 침윤되었는데, 특히 중심동맥주위에서 강한 IgM양성반응을 보이는 세포들이 관찰되었다(Fig. 11). 한편 동맥주위 임파구초를 구성하고 있는 Thy1.2 양성 세포들은 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 1일과 3일에는 대조군(Fig. 12)과 유사한 형태를 보였으나, 7일에는 동맥주위임파구초를 구성하고 있는 임파구들중 변연부의 세포들이 일부 파괴된 것이 관찰되었으며, 14일과 21일에는 동맥주위임파구초내의 많은 T세포들이 파괴되어 불규칙한 형태로 변화되었으며(Fig. 13), B-cell dependent area내에 Thy1.2 양성세포들이 침윤된 것이 관찰되었다.

고 찰

PAH가운데 benzo[a]pyrene과 DMBA에 의해 유발되는 면역독성의 생화학적 기전과 표적 세포를 밝히기 위한 많은 연구가 이루어졌으며(Stjernswärd, 1966; Ball, 1970; Bigger *et al.*, 1980; Ehlich *et al.*, 1983; Ward *et al.*, 1984; White *et al.*, 1985), Benzo[a]pyrene이 대식세포를 포함한 임파구계 세포에 심각한 영향을 미치는 반면에(Lyte & Bick, 1986), DMBA의 면역독성에 대한 표적세포의 감수성은 밝혀지지 않았으나(Burchiel *et al.*, 1990), 쥐에서는 T세포에 중요한 영향을 미친다(House *et al.*, 1987, 1989). DMBA에 의한 체액성 면역억제는 표적세포인 B세포와 대식세포의 억제로 인해 유발될 수 있는데(Yamashita & Hamaoka, 1982), 표적세포에 대한 직접적 영향 때문인지 또한 간접적 영향 때문인지에 대해서는 분명하지 않다. 임파기관인 골수(Fohlmeister *et al.*, 1982), 흉선(Burchiel *et al.*, 1988), 비장(Ward *et al.*, 1986; House *et al.*, 1987), 임파절(Halliday *et al.*, 1990; Burchiel *et al.*, 1990), peyer's patch(Burchiel *et al.*, 1990) 등에 미치는 DMBA의 영향에 대한 많은 연구가 되고 있지만 지금까지 면역조직화학적 및 미세구조적 연구는 이루어지지 않고 있는 실정이다. 본 실험결과에 의하면 비장의 무게는 DMBA의 투여량과 시간경과에 따라 크게 감소하였는데, 비장의 무게는 50 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA 투여군이 7일, 14일 및 21일에 대조군에 비하여 각각 12.8%, 47.4% 및 39.1%가 감소하였고, 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 7일, 14일과 21일에는 각각 42.7%, 66.7% 및 69.7%의 감소율을 나타냈으며, 비장의 세포수도 심하게 감소하였는데, 이러한 변화는 DMBA의 표적세포가 골수의 다능력 조혈간세포이기 때문이거나(Fohlmeister *et al.*, 1982, 1986), DMBA의 지속적인 면역억제 작용(Ehrlich *et al.*, 1983; Dean *et al.*, 1985; Ward *et al.*, 1986; Burchiel *et al.*, 1988)때문에 초래되는 것으로서 본 연구결과는 Burchiel 등(1988)의 연구와 유사한 소견을 나타냈으나, DMBA가 비장의 무게, 비장 및 골수의 세포성은 현저히 감소시켰으나, 체중 및 흉선의 무게와 세포성에는 영향을 미치지 않았다고 한 Ward 등(1984)의 보고와는 다른 결과를 보이고 있는데,

이는 Ward 등이 DMBA투여 후 5일 이내의 짧은 기간내에 실험을 수행한 사실을 주목할 필요가 있으며, 따라서 DMBA의 지속적이고 점진적인 면역독성을 정확히 파악하기 위해서는 실험기간을 길게 설정할 필요가 있다고 사료된다.

50 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여군의 비장은 실험 전기간을 통하여 뚜렷한 조직학적 변화가 관찰되지 않았으나, 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 14일에는 정맥동이 확장되고 적수내에 다핵구 침윤이 현저하였으며, 거핵구의 소멸과 함께 조혈작용이 심하게 억제되었고, 혈철소를 탐식한 대식세포의 뚜렷한 증가 및 적수와 백수, 특히 적수내에서의 세망섬유와 교원섬유의 현저한 발달과 함께 동맥주위 임파구초를 형성하고 있는 다수의 T세포들이 파괴되었고, 21일에는 소수의 거핵구가 관찰되었으며, 조혈작용도 부분적으로 회복되었다. Lee와 Lee(1992)는 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 14일에 골수의 심한 형성부전과 함께 말초혈액에서는 Howell-Jolly bodies와 basophilic stippling를 동반한 다엽성 대적혈구의 현저한 증가 및 심한 백혈구 감소증을 관찰하였는데, 본 연구결과 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 14일에 비장의 조혈기능이 가장 심하게 억제되었던 바, DMBA는 조혈기관을 구성하고 있는 세포들에 대하여 강한 세포독성을 나타내는 것으로 사료된다. 한편, Ball(1970)은 60 μg 의 DMBA를 갖 태어난 마우스에 1회 투여함으로써 흉선임파종의 높은 발생율과 함께 체액성 항체 반응의 영구적인 억제가 초래된 반면 B(a)P와 MCA는 면역억제를 시키지 못했다고 하였고, Yamashita와 Hamaoka(1982)는 DMBA가 협조 T세포와 항원제시성 대식세포의 활성은 심하게 억제시킨 반면에, B세포는 면역억제가 일어나지 않았다고 하였으며, Ehrlich 등(1983)의 연구결과에 의하면 DMBA가 비장내의 세포수와 NK 세포의 활성을 심하게 억제시켰는데, 이러한 억제작용은 DMBA의 NK 세포 또는 NK precursors에 대한 직접적 영향 때문이거나, 이들 세포를 손상시키는 간접적 작용, 또는 NK 세포의 성숙과 분화에 미치는 영향때문에 초래될 수가 있으며, 백혈병을 유발시킬 수 있을 정도의 방사선 조사후 4~5주가 경과하면 비장의 세포성이 정상으로 회복이 되는 반면에, 고농도의 DMBA(6 mg)를 투여하게 되면 비장의 세포성이 전혀 복구되지 않는다고 하였는데, 본 연구에서는 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 14일 경과시에 비장조직내에 교원섬유와 세망섬유에 의한 섬유화가 현저하였다. 면역기관을 형성하고 있는 세포들의 분포 및 형태학적 특징을 밝히기 위해서 면역조직화학적 방법을 이용한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 최근에는 유식세포 분석기를 이용함으로써 면역세포들의 세포학적 변화를 밝히는데 크게 도움이 되고 있다.

한편 PAH인 DMBA의 면역기관에 미치는 면역독성을 밝히기 위해 많은 연구가 이루어져 왔지만, 그러한 연구들이 주로 *in vitro* 상태에서 수행되어 왔으며, 면역기관을 형성하고 있는 면역세포들에 대한 면역조직화학적 연구는 전혀 되어 있지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 DMBA의 흉선 및 비장에 미치는 면역독성을 밝히기 위해, Thy1.2 항체와 IgM항체를 이용하여 면역형광염색을 실시하였다. 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 비장에서는 14일에 동맥주위 임파구초내의 T세포중 다수가 파괴되었고, 백수내의 중심동맥주위에서 강한 IgM 양성반응을 보이는 세포들이 관찰되었으며, 적수내에서는 IgM항체에 양성반응을 보이는 세포들이 감소하였다. 이상의 연구결과에 의하면 DMBA는 T세포에 강한 세포독성을 나타내고 B세포도 억제시키는 것으로 생각된다. 한편, 강력한 면역독성 작용을 갖고 있는 것으로 밝혀진 DMBA에 대한 많은 연구가 이루어졌지만, 지금까지 비장에 미치는 DMBA의 영향에 대한 미세구조학적 연구는 시도된 바가 없다. 본 연구결과에 의하면 비장에서는 100 $\mu\text{g/g}$ 의 DMBA투여 후 7일에 적수내에서 파괴된 적혈구들을 탐식한 대식세포가 증가하였으며, 14일에는 백수내의 다수의 임파구들이 괴사 및 파괴되었고, 적수내 적혈구 파괴도 현저하였으며, 이러한 파괴된 세포를 탐식한 대식세포의 뚜렷한 증가가 관찰되었다. 21일에도 14일과 유사한 소견을 나타냈다. 본 연구결과, 저농도의 DMBA(50 $\mu\text{g/g}$)는 비장조직에 대한 뚜렷한 형태학적 변화를 일으키지 않았으나 고농도의 DMBA(100 $\mu\text{g/g}$)는 비장조직내 조혈기능의 심한 억제, T임파구의 현저한 감소 및 세망섬유와 교원섬유에 의한 뚜렷한 섬유화가 형성되었는데, 이러한 급성병변이 전암성 병변으로서 어떠한 역할을 하는지를 알기 위해서는 장기간에 걸친 실험이 필요하다고 사료된다.

참고문헌

- Ball, J.K. (1970): Immunosuppression and carcinogenesis: Contrasting effects with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, benze[a]pyrene, and 3-methylcholanthrene. *J. Nat. cancer Inst.* **44**, 1-10.
- Bigger, C.A.H., Tomaszewski, J.E., Andrews, A.W. and Dipple, A. (1980): Evaluation of metabolic activation of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene *in vitro* by Aroclor 1254-induced rat liver S-9 fraction. *Cancer Research* **40**, 655-661.
- Burchiel, S.W., Madley, W.M., Barton, S.L., Fincher, R.H., Lauer, L.D. and Dean, J.H. (1988): Persistent suppression of humoral immunity produced by 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) in B6C3F1 mice: Correlation with changes in spleen cell surface markers detected by flow cytometry. *Int. J. Immunopharmac.* **10**, 369-376.
- Burchiel, S.W., Davis, DEA, P., Gomez, M.P., Montano, R.M., Barton, S.L. and Seamer, L.C. (1990): Inhibition of lymphocyte activation in splenic and gut-associated lymphoid tissues following oral exposure of mice to 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **105**, 434-442.
- Dean, J.H., Ward, E.C., Murray, M.J., Lauer, L.D. and House, R.V. (1985): Mechanisms of Dimethylbenz[a]anthracene induced immunotoxicity. *Clin. Physiol. Biochem.* **3**, 98-110.
- Dean, J.H., Ward, E.C., Murray, M.J., Lauer, L.D., House, R.V., Stillman, W., Hamilton, T.A. and Adams, D.O. (1986): Immunosuppression following 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. II. Altered cell-mediated immunity and tumor resistance. *Int. J. Immunopharmacol.* **8**, 189-198.
- Ehrlich, R., Efrati, M., Malatzky, E., Shochat, L., Eyal, A.B. and Witz, I.P. (1983): Natural host defence during oncogenesis. Nk activity and dimethylbenz[a]anthracene carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **31**, 67-73.
- Fohlmeister, I., Schaefer, H.E. and Fischer, R. (1982): On the pathogenesis of preleukemic myelodysplastic syndromes: Development of a dysplastic hemopoietic proliferation in the rat after a single pulse dose of Dimethylbenz[a]anthracene(DMBA). *J. Cancer res. Clin. Oncol.* **104**, 249-261.
- Fohlmeister, I., Hohentanner, O. and Porr, A. (1986): Recovery Patterns of rat hemopoietic stem cells between pulse doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) applied in a leukemogenic regimen. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **11**, 237-242.
- Halliday, G.H., Cavanagh, L.L. and Muller, H.K. (1988): Antigen presented in the local lymph node by cells from Dimethylbenz[a]anthracene-treated murine epidermis activates suppressor cells. *Cellular Immunology* **117**, 289-302.
- Halliday, G.M., Cavanagh, L.L. and Muller, H.K. (1990): Immunophenotypic and cell cycle analysis of lymph node cells from dimethylbenzanthracene-treated mice. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* **58**, 389-395.
- House, R.V., Lauer, L.D., Murray, M.J. and Dean, J.H. (1987): Suppression of T-helper cell function in mice following exposure to the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and its restoration by Interleukin-2. *Int. J. Immunopharmac.* **9**, 89-97.
- House, R.V., Pallardy, M.J., and Dean, J.H. (1989): Suppression of murine cytotoxic T-lymphocyte induction following exposure to 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene:

- Dysfunction of antigen recognition. *J. Immunopharmac.* **11**, 207-215.
- Lee, D.Y. and Lee, S.M. (1992): Hematopathological Effects of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene on bone marrow in BALB/C mouse. *J. Anim. Sci. & Tech.* **17**, 87-94.
- Lyte, M. and Bick, P.H. (1986): Modulation of interleukin-1 production by macrophages following benzo[a]pyrene exposure. *Int. J. Immunopharmacol.* **8**, 377-381.
- Stjernswärd, J. (1966): Effect of noncarcinogenic and carcinogenic hydrocarbons on antibody-forming cells measured at the cellular level *in vitro*. *J. Nat. Cancer Inst.* **36**, 1189-1195.
- Thurmond, L.M., House, R.V., Lauer, L.D. and Dean, J.H. (1988): Suppression of splenic lymphocyte function by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA) *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmac.* **93**, 369-377.
- Ward, E.C., Murray, M.J., Lauer, L.D., house, R.V., Irons, R. and Dean, J.H. (1984): Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. I. Effects on humoral immunity and host resistance. *Toxicol. Appl. Pharmac.* **75**, 299-308.
- Ward, E.C., Murray, M.J., Lauer, L.D., House, R.B. and Dean, J.H. (1986): Persistent suppression of humoral and cell-mediated immunity in mice following exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Int. J. Immunopharmac.* **8**, 13-22.
- White, K.L., Lysy, H.H. and Holsapple, M.P. (1985): Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: A structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology* **9**, 155-164.
- Wojdani, A. and Alfred, L.J. (1984): Alterations in cell-mediated immune functions induced in mouse splenic lymphocytes by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Research* **44**, 942-945.
- Yamashita, U. and Hamaoka, T. (1982): Selective suppression of host T cell and macrophage activities during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced carcinogenesis. *GANN* **73**, 773-782.