

지방산을 투여한 마우스의 *Salmonella typhi*에 대한 항체 생성력

인제대학교 부산백병원 임상병리과, 인제대학교 임상병리학과,* 부산수산대학교 미생물학과**

이정화 · 김용호* · 이원재** · 함건주

국문초록: 지방산 식이가 항체 생성력에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 ICR계 마우스를 기본 사료만 투여한 대조군, 돈유 투여군, 그리고 정어리유 투여군으로 나눈 다음, 추출한 지방산을 8주 동안 경구 투여한 후, 마우스 간조직 중의 지방산 조성 변화, *Salmonella typhi*에 대한 항체 역가, 복강 내 대식세포의 탐식능 및 비장세포의 증식능을 비교 관찰한 결과는 다음과 같다. 대조군에 비하여 돈유 투여군에서는 C_{18:3}, C_{20:3}, C_{20:4} 등의 지방산이 감소하였고, 정어리 투여군에서는 C_{18:1}, C_{18:2}/C_{18:0}를 제외한 주요 불포화 지방산 성분이 감소되었다. 대식세포의 탐식능에서는 대조군에 비하여 실험군의 대식세포 탐식능이 저하되었고, 마우스 생체 항체 생성력은 돈유 투여군이 대조군 및 정어리유 투여군보다 높은 역가를 나타내었으며, 마우스 비장세포 배양 상층액 중의 항체 역가는 마우스 생체 역가와는 다르게 정어리유 투여군이 더 높은 역가를 나타내었다. 또한 비장세포 증식능은 지방산 투여군이 대조군보다 높았고, 그 중에서도 정어리유 투여군이 돈유 투여군보다 높은 증식능을 나타내었다. 이러한 차이는 포화, 불포화 지방산 균형 증가에 의하여 면역 억제력이 높아진 결과로 생각되며, 포화 지방산의 투여는 항체 생성력을 현저하게 증가시킬 수는 있으나 면역억제력은 나타내지 못함을 알 수 있었다.

서 론

생물체내로 이물질이 침입하게 되면 탐식과 같은 비특이 면역계와 특이 면역계인 세포성, 체액성 면역계가 복합적으로 작용하여 외부로부터 침입한 항원에 대하여 방어 활동을 하게 된다³⁾. 최근에는 생물학, 의학, 면역학 등의 발달에 따라 감염증을 일으키는 미생물을 약독화 항원으로 조제하여 인위적으로 항체를 생성시키는 방법들이 개발되었으나, virus와 같이 항원적 특성으로 인하여 거의 항체를 생성시킬 수 없는 경우도 있다^{23,31)}. 일반적으로 실험동물을 이용하여 인위적으로 항체 생성력을 높이기 위하여 aluminium hydroxide, mineral oil, lipopolysaccharide (LPS) 등과 같은 adjuvant등이 이용되며²²⁾, 그 중 mineral oil과 같은 지질은 1970년 후반부터 면역학적 효과에 대해 연구 보고되어 있다.

Hughes 등¹³⁾은 동물실험에 linoleic acid를 투여하여 동종이식을 시킨 경우 생존 기간을 연장시켰다고 보고하고 있으며, Muhugh 등¹⁹⁾은 사람의 경우, 신장이식 거부반응의 면역억제적 식이요법제로서 고도 불포화 지방산 식이를 이용하였고, 1978년 Meade와 Mertin²⁰⁾은 지방산의 식이조절이 면역기능에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하게 되었다. 한편, 그린랜드에 거주하는 에스키모인에게서 관상동맥질환, 혈전증, 류마치스 관절염 및 건선 등의 발생률이 낮은 이유는 eicosapentaenoic acid(EPA), docosahexaenoic acid(DHA)와 같은 ω -3 불포화 지방산이 다량 함유된 지방질의 섭취와 관련이 있다는 사실이 많은 연구자들에 의하여 보고되었고^{2,34)}, Lee¹⁵⁾ 등은 어유의 섭취가 대식세포나 단핵구의 5-lipoxygenase 경로를 저해하여 leukotriene B₄의 생성을 저해함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. 이외에도 불포화 지방산의 섭취에 따라 cytokine 생성억제와 lymphocyte의 분화 및 성장 억제²¹⁾, 그리고 interleukin-1(IL-1) 및 tumor necrosis factor(TNF)의 생성 억제 등⁸⁾을 나타냄으

*논문접수 1995년 10월 30일, 수정재접수 1995년 11월 25일.

**별책요청 저자

로써 면역계에 관여함을 시사하고 있다. 이에 비하여 포화 지방산이 면역계에 미치는 효과에 관한 연구는 매우 드물다. 따라서 포화 지방산의 분자구조, 용해도, 단백질에 대한 친수성과 같은 물리화학적 특성이 불포화 지방산과 다르므로 면역 효과에 미치게 되는 영향도 다를 것이라는 점에 착안하여 동물성 지방 중 그 포화 지방산의 구성비가 높고, 보통 식용으로 많이 이용되고 있는 돈유에서 포화 지방산을 추출하고, 대조군으로서는 불포화 지방산의 함량이 높은 정어리유에서 지방산을 추출하여 실험동물에 일정기간 경구적으로 투여한 다음, 이에 따른 마우스 생체내 지방산 조성의 차이가 *Salmonella typhi* 항원에 대한 항체 생성력에 미치는 영향을 비교 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

어유

본 실험에 사용한 어유는 정어리유로서 부산시 사하구에 소재하고 있는 사료공장 (주, 대일사료)에서 정어리 어분 제조시 부산물로 얻어지는 원심분리유로부터 추출하여 사용하였다.

실험 동물

본 실험에 사용된 실험 동물은 체중 15-20g의 ICR계 마우스를 구입하여 1주일 동안 실험조건과 동일하게 사육시키면서 건강상태를 관찰한 후 이용하였다.

정어리유 및 돈유 추출

정어리유의 추출은 Lee 등¹⁶⁾의 방법을 변형하여 실시하였고, 돈유의 추출은 Folch 등⁹⁾의 방법에 따라 실시하였으며, 각 추출유는 질소 치환 후 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

식이방법

건강상태가 확인된 마우스를 정상 대조군, 정어리유 투여군, 돈유 투여군으로 구분하여 1군당 5마리씩으로 하였다. 정상 대조군은 실험기간 중 기본 사료만을 투여하였고, 정어리유 및 돈유 투여군은 앞과정에서 추출된 정어리유와 돈유를 각 실험군의 마우스에 50 μ l / 2 days로 기본 사료와 함께 8주 동안 경구적으로 투여하였다.

항원

부산 P병원의 환자로 부터 분리 동정된 *Samonella typhi*를 면양 혈구 한천 배지에 도말하여 24시간 배양시킨 후 집균시켜 항원으로 이용하였다.

항원 접종

항원제조는 Shimada 등³⁰⁾ 방법에 따라 실시하였으며, 항원은 1.2 \times 10⁹ cells/ml 농도로 조제된 사균액을 4일간격으로 50 μ l씩 피하에 4회 접종하였으며, 최종 접종 후 제 6일에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다.

대식세포 탐식능력 시험

탐식능력 시험¹²⁾은 먼저 각 군의 마우스 복강내 대식세포를 Ficoll-hypaque 밀도원심구배법(S. G. 1.077)으로 분리한 다음, 단핵구는 부착법에 의하여 제거시켰다. 정제된 대식세포는 혈구 계산기에서 세포수를 1 \times 10⁶ cells/ml로 조정된 뒤 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 부유시켜 37℃에서 가온하였다. 임상 검체에서 분리한 *Candida albicans*를 면양혈구 한천배지에 24시간 증식시켜, HBSS에 1 \times 10⁷ cells/ml로 부유시킨 후 대식세포 부유액과 혼합하여 37℃에서 15분간 회전배양시켰다. 혼합 배양액 0.1ml를 취해서 슬라이드에 고정시킨 후 Wright 염색⁹⁾을 하여, 현미경으로 관찰하였다. 탐식능력은 전체 대식세포수에 대하여 *Candida albicans*를 탐식한 대식세포수를 백분율로 나타내어 각 군의 탐식능력을 비교 관찰하였다⁴⁾.

임파구 및 비장세포의 조제

각 실험군으로부터 헤파린(20U/ml)으로 전처리된 주사기를 이용하여 심장 천차법에 의하여 채혈하였고, 무균적으로 비장을 떼어낸 다음, 철망사로 잘게 균질화시켜 RPMI 1640 배지 (GIBCO) 에 부유시켰다. Ficoll-Hypaque 밀도원심구배법에 의해 단핵세포를 분리하였다. 각각 분리된 단핵세포는 trypan blue dye exclusion법으로 세포의 생존율을 확인한 다음 5% heatinactivated fetal bovine serum(GIBCO)과 antibiotic-antimycotic(GIBCO)이 첨가된 RPMI 1640배지에 부유시켜 세포수를 1 \times 10⁷ cells/ml로 조정하였다. 혈액에서 단핵세포 분리시 혼입된 적혈구는 tris-buffered ammonium chloride (0.17M tris methane, 0.16M ammonium chloride, pH 7.2) 용액으로 제거

시킨 뒤 세포수를 조정하였다^{11,25,29)}

Methyl-³H thymidine uptake 시험

세포수가 조정된 세포부유액을 100 μ l씩 96well U plate(Corning Co., USA)의 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 IL-2(1mg/ml, BM)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양시키고, 항원을 40 ng/ml이 되게 첨가한 뒤 다시 4일 동안 배양시켰다. 세포를 회수하기 16-18시간 전에 methyl-³H thymidine (sp. act. 25Ci/mmol, 9.25 GBq/mmol : Amersham, USA)을 1 μ Ci/10 μ l이 되도록 첨가하고, 세포는 cell harvester(Flow Lab, USA)에 의해 세포회수용 filter paper를 이용하여 회수하였다. Disc를 건조시킨 후, 소형용기에 담아 scintillation fluid (Instra-Gel XF, Packard, USA)를 2ml씩 첨가하여, β -counter(Packard, USA)로 counts per minutes(cpm)을 측정하였다^{21,33)}.

항체 역가 측정

마우스 생체내 항체 역가는 slide-agglutination 법¹⁴⁾을 이용하여 마우스 혈청 중의 항체역가를 측정하였다. 한편, 시험관내 비장세포 배양액 중의 항체 역가 측정은 다음과 같이 실시하였다. 돈유, 정어리유를 투여한후 항원을 자극시킨 6일 후에 비장세포를 무균적으로 채취하여 phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 로 수회 세척한 다음, 시험관내에 배양하고 다시 동일항원으로 자극시킨 후, 세포 배양 상층액을 농축시켜, 항체 역가가 검출되지 않는 사람의 혈청과 혼합시켜 그 응집여부를 관찰하였다.

혈청 단백질 전기영동

Cellulose acetate 전기영동법¹⁾으로 시행하였으며, 각 혈청 단백질의 상대적인 양은 Cliniscan 2 (Helena Lab, USA)를 이용하여 525nm에서 측정하여 백분율로 나타내었다.

간세포의 지방산 분석

Packer의 방법²⁷⁾에 따라 간조직에서 간세포를 분리한 후 Folch등⁹⁾의 방법에 의해 간세포에서 지방을 추출하였다. 추출한 지방은 Miller와 Berger²⁴⁾의 방법으로 분석 하였다. 분석조건은 Hewlett-Packard 5890A(GLS, USA)으로 fused-silica capillary column(25 \times 0.2mm)이 부착된 gas liquid chromatography를 이용하여 air 40psi, H₂

30psi, N₂ 20psi의 압력에서 평균 400ml/min, 30ml/min, 30ml/min의 유속으로 injector temperature 250 $^{\circ}$ C, detector temperature 300 $^{\circ}$ C, oven temperature를 매분 5 $^{\circ}$ C상승시켜 170 $^{\circ}$ C에서 300 $^{\circ}$ C까지로 하여 Flame ionization detector로 검출하였다.

결 과

지방산 투여에 따른 마우스 간조직 중의 지방산 조성의 변화

추출한 정어리유와 돈유를 각 실험군에 대하여 8주 동안 경구 투여한 후, 간조직 중의 지방산 조성을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 대조군의 간조직 중 1%이상 함유된 지방산은 C_{16:0} 30.6%, C_{18:0} 16.9%, C_{18:1} 10.7%, C_{18:2}/C_{18:0} 22.7%, C_{20:3} 2.1% 그리고 C_{20:4} 10.3%이었고, 실험군 중 돈유를 투여한 실험군은 C_{16:0} 28.3%, C_{18:0} 17.3%, C_{18:1} 12.4%, C_{18:2}/C_{18:0} 24.1%, C_{20:3} 1.6% 그리고 C_{20:4} 9.7%로 나타났다. 또한 정어리유를 투여한 실험군은 C_{16:0} 31.9%, C_{18:0} 17.0%, C_{18:1} 11.7%, C_{18:2}/C_{18:0} 21.5%, C_{20:3} 1.9% 그리고 C_{20:4} 9.5%이었다. 따라서 C_{16:0} 및 C_{18:0}의 포화 지방산의 불포화 지방산에 대한 상대적 비율은 대조군이 47.5%, 돈유 투여군이 45.6%, 정어리유 투여군이 48.9%이었으며, 포화, 불포화 지방산 조성의 균형은 정어리유 투여군이 가장 높았다.

항원을 투여한 후 혈청 단백질의 전기영동상의 변화

*Salmonella typhi*로 조제한 항원을 접종시킨 후, 항체역가를 간접적으로 추정하기 위하여 실험군의 혈청 단백질 변화를 전기영동상으로 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 항체 성분인 immunoglobulin G영역의 변화는 대조군에서는 전체 혈청 단백질의 0.2%로서 거의 존재만 확인될 정도였으나, 지방산 투여군 중 돈유 투여군은 17%, 정어리유 투여군은 10%로 현저하게 증가하였고 정어리유 투여군에 비하여 돈유 투여군이 약 7% 정도 더 높게 증가되었다.

*Candida albicans*에 대한 대식세포의 시험관내 탐식능의 비교

지방산 투여 후의 대식세포에 의한 *Candida albicans*의 탐식능을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 즉 대조군의 탐식능은 26%, 돈유 투여군은

Table 1. Fatty acid composition of liver cells in control and oil fed mice

Groups	Fatty acid(%)								Total
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2} /C _{18:0}	C _{18:3}	C _{20:3}	C _{20:4}	Others	
Control group (n ^a =5)	30.6±0.3 ^b	16.9±0.5	10.7±0.8	22.7±0.5	1.3±0.1	2.1±0.1	10.3±0.1	3.3±0.4	97.6±0.3
Pig oil fed group (n=5)	28.3±0.8	17.3±0.5	12.4±0.6	24.1±0.3	0.7±0.1	1.6±0.1	9.7±0.2	3.5±0.2	97.5±0.1
Fish oil fed group (n=5)	31.9±0.7	17.0±0.1	11.7±0.1	21.5±0.7	0.5±0.1	1.9±0.1	9.5±0.9	3.2±0.9	97.1±0.1

^a Number of case, ^b Average±standard deviation.

(p<0.05)

Table 2. Amounts of serume proteins present in mice fed on different oils

Groups	Proteins ^a (%)				
	Albumin	α_1 globulin	α_2 globulin	β globulin	γ globulin
Control(n ^b =5)	48.0±0.1 ^c	8.4±0.4	15.9±0.8	27.6±0.4	0.2±0.1
Pig oil fed group(n=5)	41.1±2.1	10.9±0.4	4.8±2.0	27.1±1.5	16.7±1.2
Fish oil fed group(n=5)	43.1±1.7	14.3±1.9	4.8±0.4	29.1±1.1	9.6±1.5

^a Proteins were separated by cellulose acetate electrophoresis. ^b Number of case, ^c Average±standard deviations.

Table 3. Phagocytic activities of macrophages isolated from control and oil fed mice

Groups	Number of total Macrophage ^a	Number of phagocytic Macrophage	Phagocytic activity(%) ^b
Control group(n ^c =5)	331±18 ^d	85±12	25.5
Pig oil fed group(n=5)	338±20	68±4	20.2
Fish oil fed group(n=5)	341±35	58±7	17.2

^a Number of counted total macrophages showed over 30 cells/each count

^b Phagocytic activity(%) = $\frac{\text{No. of phagocytic macrophage}}{\text{No. of total macrophage}} \times 100$

^c Number of case

^d Average±standard deviations.

20%, 정어리유 투여군은 17%로 대조군에 비하여 지방산 투여군의 대식세포의 탐식능은 낮았으며, 실험군 중 정어리유 투여군이 돈유 투여군보다 3% 정도 더 낮았다.

생체내 항체생성력의 비교

대조군과 실험군으로부터 채혈된 혈청을 생리식염수에 계단 희석시킨 다음, 실험동물에 접종시켰던 동일한 항원과 반응시킨 결과, Table 4와 같은 항체역가를 나타내었다. 대조군과 정어리유 투여군의 항체역가는 희석시키지 않은 혈청

에서 각각 약한 응집력만을 나타내었으며, 이에 비하여 돈유를 투여한 실험군은 1:2⁴까지 높은 역가를 나타내었다.

비장세포 배양 상층액 중의 항체 역가

대조군과 실험군의 비장세포 배양액에서 일정량의 항원을 접종시킨 후 그 상층액을 동결건조시킨 다음 정상 혈청에 재부유시켜 계단 희석하여 항체 역가를 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 대조군은 두 마리에서만 희석시키지 않은 혈청에서 약한 항체 역가를 보인 반면, 실험군에서는

Table 4. Antibody titers of sera in control and oil fed mice

Serial dilution	Control group					Pig oil fed group					Fish oil fed group				
	+	-	+	-	+	++ ^c	++	++	++	++	-	+	+	-	-
2 ⁰	+ ^a	- ^b	-	+	-	++ ^c	++	++	++	++	-	+	+	-	-
2 ¹	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-
2 ²	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
2 ³	-	-	-	-	-	++	+	++	++	-	-	-	-	-	-
2 ⁴	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Weak agglutination to used antigen, ^b No agglutination to used antigen, ^c ++ Strong agglutination to used antigen.

Table 5. Antibody titers in culture supernatants of spleens from control and oil fed mice

Serial dilution	Control group					Pig oil fed group					Fish oil fed group				
	+	-	+	-	+	++ ^c	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2 ⁰	+ ^a	- ^b	-	+	-	++ ^c	++	++	++	++	++	++	++	++	++
2 ¹	-	-	-	-	-	++	+	+	+	++	++	++	++	++	++
2 ²	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	++	++	+	++	++
2 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
2 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ⁹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Weak agglutination to used antigen, ^b No agglutination to used antigen, ^c ++ Strong agglutination to used antigen.

Table 6. The blastogenic response to antigen stimulation of spleen cells from mice fed on different oils

	Control group (n ^a =12)	Pig oil fed group (n=75)	Fish oil fed group (n=74)
Spleen cell (cpm/min)	74,551.0±18,126.0	142,802.0±5,113.0	173,449.0±46,041.0

^a Number of case, ^b Average±standard deviations.

(p<0.05)

각각 2², 2³배까지 높은 항체 역가를 나타내었으며, 돈유를 투여한 실험군은 1:2²배까지, 정어리유를 투여한 실험군은 1:2³배까지 항체역가를 나타내었다.

항원 자극에 의한 비장세포 증식능의 비교

Salmonella typhi 항원 자극에 의한 대조군과 실험군 비장세포의 응답성을 시험관내에서 간접적

과를 Table 6과 같이 나타내었다. 돈유 투여군의 평균 cpm값은 대조군에 비하여 약 48% 증가되었고, 정어리유 투여군은 대조군에 비하여 약 57%가 증가되어 돈유 투여군에 비하여 높은 세포 증식능을 나타내었다.

고 찰

지방질은 생체내 영양원의 구성성분 뿐만 아니라 에너지 저장 물질로서의 기능과 phospholipids나 glycolipids와 같은 극성지방은 세포막의 주요 성분으로 이용되며, arachidonic acid와 ω -3 고도 불포화지방산은 prostaglandins으로의 전환 등과 같이 생명체에 특수한 물리화학적 기능을 가지는 필수 성분이며, 이외에도 생체 면역계와도 관계가 있다.^{7,26)}

생체 방어에 관련된 면역 기능 중 대식세포에 의한 탐식 작용은 생체 외부로부터 침입한 이물질과 반응하여 이물질을 제거하거나 침입한 이물질에 대한 정보를 세포성, 체액성 면역계에 전달하는 항원제시기능으로서 중요하다.⁹⁾

한편, 지방산 투여 후 간 세포 중의 지방산 조성의 변화는 돈유 및 정어리유 투여군에서는 $C_{18:1}$ 과 $C_{18:2}$ 를 제외한 $C_{18:3}$, $C_{20:3}$ 및 $C_{20:4}$, 불포화지방산의 감소를 보여 Fritsche 등¹⁰⁾의 연구결과와 일치된 경향을 보였고, 고지방산 식이에 의하여 생체내 지방산 조성을 변화시킬 수 있다고 한 Lefkowith 등¹⁷⁾의 연구결과와도 일치하였다. 또한 항원제시세포로 중요한 기능을 가진 대식세포의 탐식능력은 지방산을 투여한 후 대조군에 비하여 모두 감소되었다. 이는 기본사료만으로 사육시킨 마우스의 대식세포에 비하여 포화, 불포화지방산을 투여한 마우스의 대식세포막의 지방산 조성에 변화를 초래하게 되고, 이와같은 대식세포막의 지방산 조성 변화는 대식세포 기능에 크게 영향을 미치게 되며³³⁾, 대식세포막의 지방산 조성 변화에 의한 막 유동성 변화는 대식세포 탐식능력에도 영향을 미칠 수 있다고 생각된다. 또한, 돈유 투여군에 비하여 정어리유 투여군이 더 낮은 탐식능력을 보이는 것은 정어리유에 많이 함유되어 있는 $C_{20:3}$ 가 arachidonate로부터 leukotriene C_4 와 B_4 합성을 저해하기 때문인 것으로 생각되며, ω -3 고도 불포화지방산 또는 어유 섭취는 대식세포를 포함한 단핵구에서 $\Delta 6$ -desaturase 활성의 억제, cyclooxygenase 및 5-

lipoyxygenase 활성의 억제 등을 통하여 염증 반응 및 면역 반응에 관여하는 세포수와 기능을 감소시켜 면역 억제 효과를 나타낸다고 한 Palmblad와 Gyllenhammer²⁸⁾의 연구보고와도 일치하고 있다. 지방산 투여 후 마우스 비장 세포의 DNA 합성 능력의 변화를 알아보기 위하여 마우스 비장 세포에 항원을 감작시킨 후 [3 H] thymidine을 이용하여 세포 증식 능력을 측정된 결과 돈유 투여군이 대조군에 비하여 약 2배의 높은 증식능력을 보였고, 정어리유 투여군이 대조군에 비하여 3.2배 높은 증식 능력을 보여 정어리유 투여군이 돈유 투여군의 비장 세포 증식 능력보다 1.2배 높은 결과를 보였다. 이와같은 비장세포의 DNA 합성 능력의 변화는 간 세포에서 분석한 지방산 조성 중 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비율에 의하여 설명이 가능하다. 즉, 사람의 섬유 아세포 배양에서 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비율이 세포 발육에 가장 현저한 영향을 미치게 되는 지시계로 Bettger⁹⁾에 의해 연구 보고되었는데, 본 연구 결과 돈유 투여군의 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비는 1.6/9.7, 정어리유 투여군은 1.9/9.5이었으며 대조군은 2.1/10.3으로써 대조군에 비하여 모두 비율이 낮았고, 특히 정어리유 투여군이 돈유 투여군에 비하여 1.2배의 차이를 보여 서로 다른 세포 발육상태를 예상할 수 있으며, 이는 DNA 합성능력의 변화와 일치된 경향을 보였다.

그러나 지방산 투여 후 사균 항원을 마우스에 면역시킨 다음 측정된 혈청 전기영동상의 γ -globulin 분획의 변화를 조사한 결과 기본 사료만으로 사육시킨 대조군에 비하여 돈유, 정어리유 투여군 모두 혈청 중의 γ -globulin은 증가되었으며, 돈유 투여군이 전체 혈청 단백질의 17%, 정어리유 투여군이 10%로서 돈유 투여군이 정어리유 투여군에 비하여 7% 높은 결과를 보여 비장세포를 이용한 DNA 합성능력이나 지방산 조성 중의 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비율을 이용한 세포 발육 예측치와는 다른 결과를 보였다.

본 연구에서 포화, 불포화 지방산을 투여한 마우스에 *Salmonella typhi* 사균을 접종하여 생성된 마우스 혈청 중의 항체 역가는 돈유를 투여한 실험군에서 평균 1:2⁴배까지 상승하였고, 정어리유를 투여한 실험군에서는 대조군과 유사한 결과를 보여, 혈청 중의 γ -globulin 변화와 유사한 경향을 보였으나, 비장세포의 DNA 합성 능력이나 지방산 중의 세포 발육에 영향을 크게 미치는 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 비율과는 서로 다른 경향을 나타내었다.

본 실험군에서 측정된 지방산 중 $C_{16:0}$ 및 $C_{18:0}$ 의 포화 지방산의 양은 대조군이 47.5%, 돈유 투여군이 45.6% 그리고 정어리유 투여군이 48.9%로서 크게 차이는 없었으나, 생체내 불포화, 포화 지방산 균형은 정어리유 투여군이 가장 높았고, 그 다음이 대조군, 돈유 투여군의 순서로 불균형이 높았다. 따라서, 불포화 지방산과 포화 지방산의 불균형이 클수록 면역억제작용이 커진다고 한 Weyan³²⁾의 연구 보고와 항원 투여 후 생체내 항체 역가의 결과와는 일치함을 알 수 있었다. 또한, 단핵구 세포막 지질의 지방산 구성의 변화에 의한 막 유동성의 변화와 함께 세포의 여러 기능을 저하시켜 체액성 면역반응이 억제된다고 한 Yano 등³³⁾의 연구 보고와 면역반응에서 항원제시세포 및 effector의 역할을 하는 대식세포의 경우 ω -3 고도 불포화 지방산 투여에 의하여 Ia 항원의 발현, IL-2 및 TNF 생성이 감소된다고 한 Linn 등¹⁸⁾의 연구 보고는 정어리유 투여 후 항체 생성 역가가 저하된 원인을 잘 설명하고 있다. 또한, 본 연구에서 지방산 투여 후 대식세포 탐식능력을 측정된 결과 돈유 투여군에 비하여 정어리유 투여군의 탐식능력이 더욱 낮은 결과를 보인 것은 대식세포에 의한 항원 제시 능력의 저하로 해석하면 돈유 투여군이 정어리유 투여군에 비하여 높은 항원제시능력을 가진 것으로 볼 수 있다.

한편, 지방산 투여 및 항원으로 감작시킨 후 적출한 비장세포를 다시 시험관에서 배양시키면서 동일한 항원으로 재감작시켜 생성된 정어리유 투여군의 비장세포 배양상층액의 항체역가는 1:2³배, 돈유 투여군 1:2²배까지 나타내어 동일항원을 이용한 마우스의 생체내 항체 역가와 다른 결과를 보였다. 즉, 돈유 투여군의 비장세포 배양상층액 중의 항체역가는 마우스 생체내 항체역가와 시험관내 세포배양 결과와는 상반된 결과를 보였다. 두 실험 조건은 동일한 종류의 지방산에 의하여 생체내 지방산 조성을 변화시켰고, 동일한 항원에 의하여 감작시켰으며, 단지 시험관내 비장세포 배양에서 조직세포 배양용 배지와 소 태아 혈청이 사용된 것이 차이점이다. 시험관내 비장세포 배양상층액 중의 항체역가는 비장세포를 이용한 DNA 합성능력이나 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비율을 이용한 세포 발육 상태의 예측 결과와는 일치된 경향을 보였고, 포화 및 불포화 지방산 균형에 의한 면역력 억제 결과와는 다른 경향을

나타내었다. 따라서 생체 혈청 중의 불포화, 포화 지방산 균형에 의한 면역억제작용이 정어리유 투여군의 생체내 항체역가 측정의 경우에는 크게 작용하여 항체역가가 대조군과 유사하였던 반면, 혈청이 제거된 비장세포의 시험관내 배양에서는 지방산에 의한 면역억제작용이 제거되어 항체생성역가가 높아진 것으로 생각되며, 생체내 불포화지방산이 항체생성력에 미치는 영향은 마우스 혈청내 지방산의 조성 변화에 의한 면역억제력에 의한 것이라고 생각된다. 이는 EPA와 DHA섭취 증가 및 그에 따른 Δ 6-desturase 활성의 감소로 인한 세포막 인지질에서의 arachidonic acid 구성감소와 이로 인한 세포막 인지질 구성 변화에 의한 IL-1, TNF 등의 생합성 감소, arachidonic acid와 같은 eicosanoids 전구물질의 감소와 섭취된 EPA 및 DHA 등에 의한 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase 활성 감소로 인한 prostaglandin E_2 (PGE₂), leukotriene B₄(LTB₄) 등의 생합성 감소 등에 의한 세포 기능의 감소³¹⁾가 항체 생성력을 저하시킨다고 생각된다. 그러나, 돈유 즉 포화지방산을 투여한 후 항체생성력은 생체내 및 시험관내 비장세포 배양상층액 중의 역가는 대조군에 비하여 증가되었고, 두 실험 사이에서는 큰 차이를 보이지 않고 생체내 항체역가에 비하여 시험관내 배양상층액 중의 역가가 다소 낮아진 결과를 보였다. 이는 DNA 합성능력으로 측정된 비장세포 증식능력이나 $C_{20:3}/C_{20:4}$ 의 비율로 부터 예측된 세포발육이 대조군에 비하여 높은 점으로 미루어 대조군에 비하여는 높은 항체역가를 보이는 것으로 생각되며, 생체내와 시험관내 배양상층액 중의 항체역가가 현저한 차이를 보이지 않는 것으로 미루어 보아 포화지방산은 불포화지방산과 같은 면역억제작용 물질로 작용하지 못하고, 포화, 불포화지방산 균형도 대조군에 비하여 높으므로 면역억제력을 나타내지 못하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 서덕규 (1982): 血清蛋白質分劃像, pp 50-52. 大學書林. 서울.
2. 이병두 (1992): 당뇨병과 ω -3 지방산. 당뇨병, 16(2): 99-191.
3. 寺田 信國 (1991): わかりやすい免疫學. pp 1-36. 메ヂカルレビュー-社. 東京.

4. 日本生化学会(1989): 新生化学实验讲座 pp 12. 东京化学同人. 东京.
5. Bettger WJ, Driscoll ER and Karmiol S(1990): Effect of cellular growth state on induces of n-6 polysaturated fatty acid status in human fibroblast. *Biochem Cell Biol*, **68**: 819-22.
6. Brown BA (1984): Hematology: Principle and procedure, pp 42-46. 4th ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
7. Carroll KK (1981): Neutral fats and cancer. *Cancer Res*, **41**: 3695.
8. Endres SR, Ghorbani VE, Kelly K, Georgilis G, Lonnemann JWM, Van der Meer JG, Gannon TS, Rogers MS, Klempner PC, Weber EJ, Schaefer SH, Wolff and Kinarello CA (1989): The effect of dietary supplementation with n-3 polysaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*, **320**: 265-271.
9. Folch J, Lee M and Stanley GHS (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem*, **226**: 497-501.
10. Fritsche KL, Cassity NA and Huang SC(1991): Effect of dietary fats on the fatty acid compositions of serum and immune tissues in chickens. *Poult Sci*, **70**(5): 1213-1222.
11. Walker RH (1992): AABB Technical manual. pp 687-688. 10th ed., American Association of Blood Banks, Maryland.
12. Hudson L and Hay FC (1987): Practical Immunology. pp 27. 3rd ed., Blackwell Sci. Public., Oxford.
13. Hughes D, Caspary EA and Wisniewski HM (1975): Immunosuppressing by linoleic acid. *Lancet*, **2**: 501.
14. John TJ, Sivadasan K and Kurien B (1984): Evaluation of passive bacterial agglutination for the diagnosis of typhoid fever. *J Clin Microbiol*, **20**(4): 751-753.
15. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese III J, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA and Austen KF (1985): Effect of dietary enrichment with eicosa-pentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med*, **312**: 1217-1224.
16. Lee KH, Jeong IH, Suh JS, Jung WJ and Ryuk JI (1988): Utilization of polysaturated lipids in red muscled fishes 3. The conditions of refining, decoloring and deodorization for processing of refined sardine oil. *Bull Kor Fish Soc*, **21**(4): 225-231.
17. Lefkowitz JB, Jakschik BA, Stahl P and Needleman P (1987): Metabolic and Functional alteration in macrophages induced by essential fatty acid deficiency. *J Biol Chem*, **262**: 6668-6675.
18. Linn T, Noke M, Woehrle M, Kloer HU, Hammes HP, Litzlbauer D, Gretzel RG and Federlin K (1989): Fish oil-enriched diet and reduction of low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia: Inhibition of macrophage activation. *Diabetes*, **38**: 1402-1411.
19. Mchugh MI, Wilkinson R, Elliott RW, Field EJ, Dewar P, Hall RR, Taylor RMR and Uldall PR (1977): Immunosuppression with poly-saturated fatty acids in renal transplantation. *Transplantation*, **24**: 263-267.
20. Meade GJ and Mertin J (1978): Fatty acids and immunity. *Adv Lipid Res*, **16**: 127-165.
21. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, Dinarello CA and Gilbach SL (1991) :Oral(n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: Comparison between young and older women. *J Nutr*, **121**: 547-555.
22. Michael S (1977): The antigen. pp 370-401. vol 4, Academic press, N.Y.
23. Mikio, M (1992): Present state of AIDS. *Modern Media* **38**(3): 116-128.
24. Miller L and Berger T (1985): Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-packard Application. Note 228-248.
25. Phillips HJ (1973): Tissue culture: Methods and Applications. pp 406-408. Academic press, N.Y.

26. Offner H and Clausen J(1974): Inhibition of lymphocyte response to stimulants induced by unsaturated fatty acids and prostaglandin. *Lancet*, **2**: 400.
27. Packer F (1974): Methods in enzymology. pp 736-737. vol 32, Academic Press, N.Y.
28. Palmblad J and Gyllenhammer H (1988) :Effect of dietary lipids on immunity and inflammation. *APMIS*, **96**: 571.
29. Rose NR, Friedman H and Fahey JL (1986): Manual of clinical laboratory immunology. pp 847-852. 3rd ed. American Society for Microbiol. Washington D.C.
30. Shimada T and Sakazaki R (1984): On the serology of *Vibrio vulnificus* Japan. *J Med Sci*, **37**: 241.
31. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh A, Tishida I and Okayama H (1991) :Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol*, **65**: 1105-1113.
32. Weyman C (1975): Linoleic acid as an immunosuppressive agent. *Lancet* 2:33.
33. Yano A, Schwartz RH and Paul WE (1977): Antigen-Presentation in the murine T-lymphocytes proliferation response. *J Exp Med*, **146**: 828-843.
34. Yetiv JZ (1988): Clinical applications of fish oils. *JAMA* **260**: 665-670.

= Abstract =

Antibody Producibilities of *Salmonella typhi* in Mice fed on Different Fatty Acids

Jung-Hwa Lee, Yong-Ho Kim*, Won-Jae Lee** and Kun-Ju Hahm

Dept. of Clinical Pathology, Pusan Paik Hospital, Inje University, Pusan 614-735, Korea

* Dept. of Medical Laboratory Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

**Dept. of Microbiology, National Fisheries University, Pusan 608-737, Korea

The effect of different fatty acids supplementation on antibody production of *Salmonella typhi* was studied in ICR mice. Subjects supplemented their diets with 50 μ g of extracted pig oil(as a saturated fatty acid) and fish oil (as a unsaturated fatty acid) / 2 days for 8 weeks. Blood was collected control and experimental groups of mice after 8 weeks of oil supplementation.

The different fatty acids supplementation reduced unsaturated fatty acids composition in mice liver such as C_{18:3}, C_{20:3} and C_{20:4} except C_{18:1} and C_{18:2}/C_{18:0} in fish oil and pig oil groups compared to control group. Also, the phagocytic activities of mice macrophages for *Candida albicans* was reduced by 6% in pig oil group and 9% in fish oil group than control group. The antigen-stimulated lymphocyte proliferative response was significantly increased by fatty acid in pig oil group(48%) but 57% in fish oil group.

The different fatty acid supplementation increased antibody production in both experimental groups than control group ; this increase was only significant in pig oil group(1:2⁴) on mice but not in fish oil group(1:2⁰) compared to control group(1:2⁰), however, increased antibody titer in both groups in-vitro spleen cell culture supernatant(1:2³ in fish oil group and 1:2² in pig oil group compared to control group 1:2⁰).

Thus, fish oil supplementation was immunosuppressive agent in macrophage phagocytosis, in-vivo antibody producibilities and lymphocyte proliferation but pig oil supplementation was more effective than fish oil in antibody formation in-vivo.

We find that antibody producibilities affected by fed on different fatty acids were considered by balance between saturated and unsaturated fatty acid, and C_{20:3}/C_{20:4} ratio. Also, it affected to antigen-stimulated lymphocyte proliferation and macrophage phagocytic activities.

Key Words: *Salmonella typhi*, saturated & unsaturated fatty acid, antibody production, lymphocyte proliferation.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 1(1) 45-54 December 1995]

* Corresponding author