

HgCl₂에 의한 다클론성 활성화에 의해 나타나는 생쥐의 면역반응 변화에 미치는 파치균 다당류의 영향

문창규* · 목명수 · 양경미 · 전선덕 · 김진형 · 김강석 · 최청하 · 황지원
서울대학교 약학대학 위생화학교실

Effects of the Polysaccharides from *Irpex lacteus* Fr. on some Characteristic Immune Responses in the Polyclonal Activation Induced with Mercuric Chloride in CBA Female Mice

Chang Kiu MOON*, Myung Soo MOCK, Kyoung Mee YANG, Sun Duck CHUN
Jin Hyoung KIM, Kang Suk KIM, Chung Ha CHOI and Ji Won WHANG

Laboratory of Hygienic chemistry, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 5, 1994; accepted December 16, 1994)

Abstract—Repeated injections of low-doses of mercuric chloride in rats or mice induce polyclonal activation which includes the induction of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies and circulating immune complex and it results in nephritis. Because this disease is autoimmune mediated disease resulted from immune dysfunction, immunomodulators are used to control the symptoms or to cure the disease. *Irpex lacteus* Fr. is a kind of new medicinal fungus. The polysaccharide fraction extracted from submerged fermentation of *Irpex lacteus* Fr. decreased the serum agglutinin, serolysin and IgM plaque forming cells in normal mice. The hitherto obtained clinical results suggested that it significantly improved the oligourea, edema, and hypertension in patients who have nephritis. To elucidate the action-mechanisms of *Irpex lacteus* Fr., we established the experimental model of HgCl₂ induced polyclonal activation by intraperitoneal administrations of HgCl₂ to mice. To assess the immunomodulating effect of *Irpex lacteus* fraction, we investigated its effects on the mitogen induced proliferation and IgM PFC counts of splenic lymphocytes in mice during the treatment of HgCl₂. The *Irpex lacteus* polysaccharide reduced the abnormally increased mitogen induced lymphocyte proliferation and IgM PFCs to almost normal levels. And the *Irpex lacteus* polysaccharides prevented the increase of serum immunoglobulin level induced by HgCl₂. These data suggested that the *Irpex lacteus* polysaccharides might have the immunomodulating activity to prevent and /or improve the HgCl₂ induced autoimmune disease.

Keywords □ *Irpex lacteus* Fr., autoimmune glomerulonephritis, lymphocyte proliferation, IgM PFC.

HgCl₂는 다클론성 면역활성 물질로 자가면역성신장염 유도제로 활용되고 있는데, HgCl₂에 의한 자가면역성 사구체 신염은 BN rat, CBA mice, C57BL/6 mice, A.Sn mice 등에 직접적인 신장독성에 의한 피사를 유발하지 않는 비교적 저용량의 HgCl₂를 수회 반복 투여함으로써 유발되고, 혈중 IgG의 증가(Ochel 등, 1991; Hutman 등,

1987), 혈중 순환 면역 복합체의 증가(Pusey 등, 1990), B cell 및 T cell의 분열능 증가(Goldman 등, 1988), INF- γ 활성증가 및 신장에서의 MHC 분자 발현증가(Madrenas 등, 1991)등의 면역병리학적 특징을 가진다. 이러한 면역병리학적 지표의 변화는 본 실험모델이 HgCl₂에 의한 직접적인 손상이 아닌 다클론성 활성화에 의한 자가면역반응에 의해 일어나는 자가면역질환임을 의미한다. 일반적으로 면역부전에 의해 유발되는 자가면역질환

* To whom correspondence should be addressed.

환의 경우 그 질환에 특징적인 면역부전을 개선하는 약물은 그 질병의 예방과 치료에 활용될 수 있다. 따라서 자가면역성 신장염의 경우 임파구 분열능, 혈중 Ig양 등이 질병에 특징적인 면역지표에 영향을 주는 약물은 자가면역성 신장염에 대한 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있다.

본 실험에서 사용한 약물은 파치균을 배양하여 그 균사체로부터 추출한 조다당으로 변이원성을 포함한 독성을 유발하지 않으며 정상 생쥐에서 혈청응집소, 용혈소, 비장 용혈반 형성세포(plaque forming cell) 수를 유의적으로 감소시키며 혈중 순환면역복합체도 유의적으로 감소시켰다. 또한 임상적으로 순환 면역복합체가 증가되어 있고 이들이 사구체에 침착된 만성사구체 신장염 환자의 빈뇨, 부종, 요통, 고혈압을 현저히 개선시키고, 증가되어 있는 IgG를 정상수준으로 회복시키는 것으로 보고되어 있다. 이와 같은 실험 결과들은 파치균의 다당류 분획이 면역반응을 조절함으로써 질환을 개선시킬 것이라는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 자가면역성 신장질환 환자에서 확인된 파치균 조다당의 임상적 치료효과에 대해서는 아직 체계적으로 그 기전이 연구되어 있지 않다(張琦 등, 1984).

따라서 저자 등은 파치균 조다당 분획의 자가면역성 사구체 신염을 치료하는 작용기전의 하나로 생각되는 면역조절작용기전을 연구하기 위해 생쥐에 다클론성 임파구 분열제인 $HgCl_2$ 를 투여하여 다클론성 활성화를 유발시키고 자가면역성 면역부전이 유발되는 조건에서 파치균 조다당을 투여하여 면역기능의 변화에 미치는 영향을 검토하고 얻은 지견을 발표하고자 한다.

실험방법

실험동물

본 실험에 사용된 C57BL/6와 CBA 생쥐는 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받아 최소 1주간 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 조명시간을 아침 7:00부터 저녁 19:00까지 12시간으로 조정하였고 실온은 $22 \pm 2^\circ C$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 조절하였다. 사료는 고품사료(삼양사)를 사용하였으며, 그 조성은 조단백 22.1%, 조지방 3.5%, 조셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이다. 급수는 수도수를 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

실험동물의 처치와 검사항목

$HgCl_2$ 를 멸균 생리식염수에 0.2 mg/ml의 비로 용해시켜 생쥐의 체중kg당 0.5~2 mg씩을 3일 간격으로 연속 5주동안 복강내 투여하여 CBA 자성생쥐에서 사구체 신염을 유도하였으며, 파치균 조다당(31, 310, 3100 mg/체중 kg)은 전기간에 걸쳐 $HgCl_2$ 를 투여하지 않는 날에 경구로 투여하였다. $HgCl_2$ 투여 시작 시점에서 4일째부터 3~4일 간격으로 실험군들의 신장기능변화 및 면역기능

변화를 측정하였다. 신장기능의 변화를 보는 지표로 혈청 중 BUN 및 Creatinine을 측정하였으며, immunoglobulin은 혈청을 $-20^\circ C$ 에 냉동 보관하여 두었다가 측정하였다. 비장은 무균상태에서 적출하여 곧바로 임파구 분열능 실험을 실시하였다.

Mitogen유도 마우스 비장세포 분열능의 측정

Mitogen에 의한 마우스 비장세포의 분열능을 측정하기 위해 DNA 합성 시기에 3H -thymidine을 가하여 DNA 합성에 이용된 방사선량을 측정하였다. 약물 투여가 끝난 후 3일째에 마우스를 수술대에서 경추탈구(cervical dislocation)로 치사시킨 후에 70% ethanol로 생쥐의 복부를 적서 소독하고 무균적으로 비장을 적출하여 무균 RPMI washing buffer(K-0 배지)로 세척하였다. 그 후 clean bench에서 homogenize tube에 적출한 비장을 넣고 가위로 가볍게 mincing 하고 K-0 배지 2 ml을 넣은 다음 teflon pestle을 이용하여 비장세포를 유리시킨 뒤 200 #의 체를 통과시켜 세포의 조직물질을 제거하였다. 300 $\times g$ 에서 6분간 원심분리하여 세포를 세척한 뒤 pellet에 재증류수를 가하여 비장 내의 적혈구를 용혈시킨 후 K-0 배지로 3번 세척하였다. 세척이 끝난 후 세포 현탁액을 complete RPMI(10% FCS 포함하는 K-0 배지) 배지에서 일정량으로 맞춘 후 trypan blue exclusion test에 의해 세포수와 세포생존율을 측정하여 8×10^6 cells/ml로 조절하였다.

96 well flat culture plate에 앞에서 조제한 8×10^6 cells/ml의 비장 세포 현탁액 50 μl , mitogen(ConA, LPS)을 각 농도별(2.5 $\mu g/ml$, 5.0 $\mu g/ml$, 10 $\mu g/ml$)로 50 μl 씩 가한 다음 complete RPMI 배지를 100 μl 씩 가한 후 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양시켰다. 3H -thymidine을 0.5 $\mu Ci/well$ 이 되도록 가하여 다시 18시간 배양후에 glass fiber filter paper에 harvest한 다음 liquid scintillation counter로 방사선량을 측정하였다.

BUN의 측정

시험관에 효소 완충액(urea 효소 0.1 ml/완충액 20 ml 영동 제약)을 1 ml씩 분주하고 여기에 혈청 10 μl 씩을 가하였다. 이때 표준 맹검으로는 증류수를 10 μl , 표준액은 요소 기준액(60 mg/100 ml urea-N)을 가하였다. $37^\circ C$ 에서 15분동안 혈청 중의 요소가 효소와 작용하도록 incubation하였다. 발색액(살리실산과 알칼리성 차아 염소산의 혼합물)을 1 ml씩 가하고 $37^\circ C$ 에서 5분간 반응시켜 발색 반응이 일어나도록 하였다. 60분 내에 UV(570 nm)에서 맹검을 대조로 흡광도를 측정하였다.

Creatinine의 측정

시험관에 피크린산(영동 제약) 1.5 ml을 가하고 대조군 및 $HgCl_2$ 투여군에서 얻은 혈청을 50 μl 씩 가하고 발색 반응이 일어나도록 $37^\circ C$ 에서 20분간 방치하여 515 nm에서 맹검용액을 대조로 흡광도를 측정하였다(흡광도 A₁). 에시드시약을 2방울 떨어뜨려 $37^\circ C$ 에서 5분 동안 creatinine만을 탈색시키고 다시 515 nm에서 흡광도를 측정하

였다(흡광도 A_2). Creatinine의 흡광도는 A_1-A_2 로 계산하였다.

IgM 용혈반 형성세포의 측정

Cunningham의 liquid slide monolayer 방법을 이용하여 IgM 용혈반 형성세포수를 검색하였다. 항체생성세포는 면양적혈구로 면역 후 4일 내지 5일에 비장에서 최고에 달하므로 면역 후 4일에 행하였다.

면양적혈구 현탁액은 Alsevier 용액에 2~4주간 보관된 면양적혈구 3 ml 과 BSS 6 ml를 15 ml conical tube (Falcon)에 가하고 250 × g에서 5분간 원심분리하여 세척하였으며 이상의 조작을 3회 반복하였다. 세포수 측정을 위한 현탁액은 pellet 1 ml당 2 ml의 PBSS buffer를 가하여 조제하였다. 생리식염수로 800배 희석 후 hemacytometer를 이용하여 RBC를 계측하여 최종 12.5%(2.5×10^9 /ml) 면양적혈구 용액을 조제하였다. PBSS buffer는 Stock I 용액(포도당 2.5 g, KH_2PO_4 150 mg, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.9 g, phenol red 25 mg, 재증류수 250 ml) 100 ml에 400 ml의 증류수를 가하여 혼합한 다음 stock II 용액($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 465 mg, KCl 1 g, NaCl 20 mg, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 50 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 500 mg, 재증류수 250 ml) 100 ml와 재증류수를 가하여 1 liter가 되게 하고 pH를 7.2로 조정하였다.

용혈반 형성세포측정을 위한 반응액은 1.5 ml microcentrifuge tube에 비장 세포현탁액 50 μ l, 1/4 complement 100 μ l, 12.5% 면양적혈구 100 μ l와 PBSS buffer 250 μ l를 가하고 혼합하였다. 상기의 반응액 50 μ l를, chamber내의 기포발생을 방지하기 위하여 37°C에 미리 따스하게 보관한 dual microchamber에 모세관현상을 이용하여 채우고 마리당 3 chamber씩을 준비하여 계측하였다. Petri dish에 Paraffin wax-Vaseline (1:1)을 40°C로 가온하여 용해하고 여기에 dual chamber의 4 접촉면 가장자리를 잠시 담구었다 꺼내어 sealing한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. 생성된 용혈반 형성세포를 목측하고 IgM 용혈반 형성세포 수/비장으로 환산하였다.

혈중 Immunoglobulin의 측정

Agarose gel이 떨어져 나오지 않도록 slide glass를 0.5 g/100 ml로 증류수에 녹인 agarose(60°C)에 전처리하였다. 항체(anti-mouse IgG rabbit Immunoglobulin)는 0.02% sodium azide - PBS에 1:50으로 희석하였다. 60°C의 agarose 용액(2% in PBS-azide)과 희석 항체액을 동일 용량 혼합하여 precoating된 slide glass에 2 ml을 균일한 면이 되도록 굳힌 뒤 gel punch로 내경 2 mm의 홀을 6~5 mm 간격으로 slide당 5~6개를 만들었다. 각 홀에 대조군 및 $HgCl_2$ 투여군의 serum을 5 μ l씩 각 홀에 가한 뒤 37°C humid chamber에서 방치후 48시간 후에 침강원의 직경을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균 \pm SE로 표시하였다. 유의성 검정은 Student's T test를 이용하여 분석하였으며, $P < 0.05$ 이

하의 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과 및 고찰

과치군 조다당은 자가면역성 사구체 신염 환자의 순환면역복합체(immune complex)의 혈중농도를 저하시키는 효과가 있음이 임상적으로 보고된 바 있다. 저자 등은 과치군 조다당의 작용기전을 검색하기 위하여 먼저 $HgCl_2$ 를 이용하여 사구체 신염을 유발시키는 원인이 되는 다클론성 활성화를 위한 조건실험을 수행하였다. 일반적으로 $HgCl_2$ 에 의한 자가면역성 사구체 신염 유발에 사용되는 동물은 주로 BN rat, CBA mice, C57BL/6 mice, A.Sn mice 등으로 종마다 $HgCl_2$ 투여에 의한 순환면역복합체등의 면역지표와 사구체 신염의 양상 등에 차이가 나는 것으로 보고되어 있다(Kammüller 등, 1989). $HgCl_2$ 를 과량 투여하면 전형적인 자가면역질환을 유도할 수 없으므로 적정수준의 면역반응을 유발할 수 있는 실험동물의 설정과 $HgCl_2$ 의 용량을 결정하기 위한 실험을 실시하였다.

실험동물은 마우스간의 특이성을 고려하여 C57BL/6와 CBA 마우스를 사용하였다. Fig. 1에서와 같이 creatinine은 정상 대조군에 비해 C57BL/6 마우스에서 $HgCl_2$ 용량이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 정상 대조군과 $HgCl_2$ 투여군 모두에서 정상 범위 내에 존재하여, $HgCl_2$ 투여가 creatinine치에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Fig. 2의 BUN치는 $HgCl_2$ 용량이 증가함에 따라 BUN치도 함께 증가하는 경향을 나타내었으나 그 변화가 비교적 근소하여 이 상태는 면역복합체의 침착에 의해서 유발되는 자가면역성 사구체 신염의 경우와 유사한 수준이다. 이는 또한 $HgCl_2$ 의 반

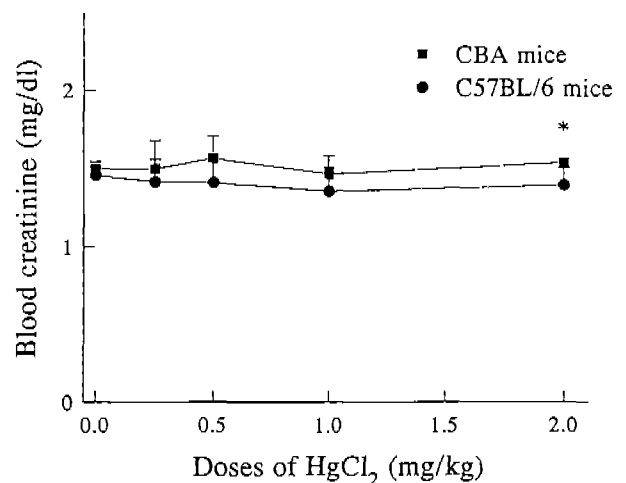


Fig. 1. Dose dependency of the serum creatinine level in CBA female mice and C57BL/6 male mice treated with $HgCl_2$. Each point represents the average of 4 mice \pm SE. Significant differences from untreated group ($P < 0.05$) are marked with an asterisk.

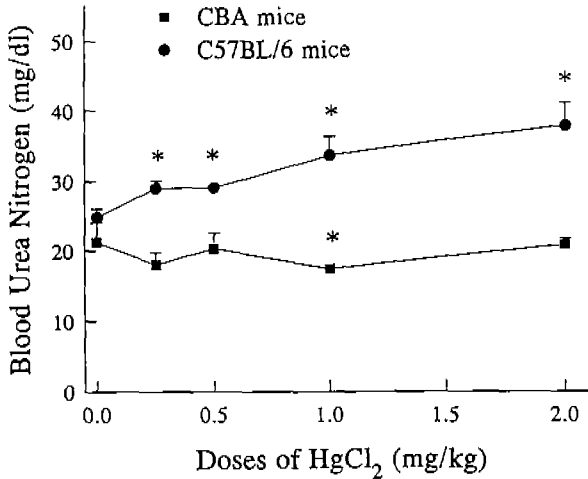


Fig. 2. Dose dependency of the blood urea nitrogen level in CBA female mice and C57BL/6 male mice treated with HgCl₂. Each point represents the average of 4 mice \pm SE. Significant differences from untreated group(P<0.05) are marked with an asterisk.

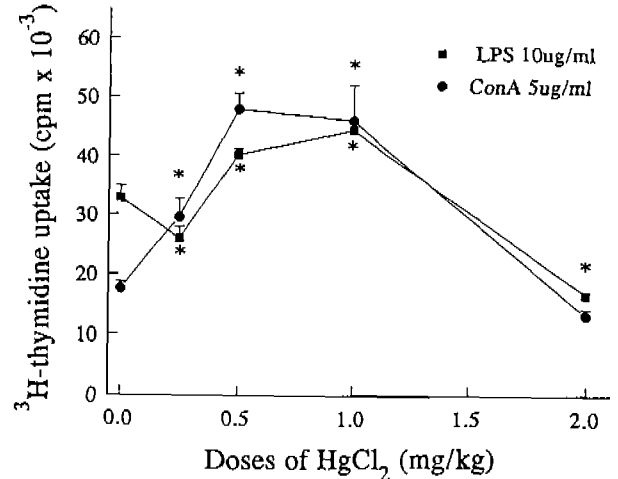


Fig. 3. Dose dependency of mitogen induced proliferation of splenocytes in C57BL/6 male mice treated with HgCl₂. Each point represents the average of 4 mice \pm SE. Significant differences from untreated group(P<0.05) are marked with an asterisk.

복제 장기 투여시 자가면역성 신장염이 유발되는 경우의 면역지표중의 하나인 IFN- γ 의 생성증가나 MHC분자 발현이 증가되는 상태에서 관찰된 BUN치나 creatinine치의 변화 정도와 유사하다. 실험에 사용된 HgCl₂ 용량 범위 내에서는 신장에 대한 직접 독성의 증거가 될 수 있는 수준의 creatinine과 BUN치의 변화가 유발되지 않으며 이는 조직학적 검사에 의해서도 직접적인 독성은 유발되지 않은 것으로 확인되었다. 그리고 마우스 종간의 감수성도 별다른 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

HgCl₂에 의해 적정수준의 면역부전이 유발되는 조건을 알아보기 위하여 HgCl₂ 투여 용량에 따른 mitogen에 대한 임파구 분열능의 변화를 살펴보았다. 역시 마우스 종간의 감수성 차이를 알아보기 위하여 C57BL/6 웅성 마우스와 CBA 자성 마우스를 대상으로 실험을 실시하였다. HgCl₂를 용량별로 투여하고, 1주일 후에 비장 임파구에 미치는 영향을 검색하고자 B cell과 T cell에 특이적으로 작용하는 mitogen인 Lipopolysaccharide(LPS)와 Concanavalin A (Con A)를 가하고 임파구 분열능을 측정하였다(Fig. 3, Fig. 4). Fig. 3에 제시된 바와 같이 C57BL/6 웅성 마우스를 실험동물로 사용하였을 때 0.5 및 1 mg/체중 kg을 투여했을 경우 임파구 분열능은 LPS와 Con A 모두에 대해서 정상 대조군에 비하여 현저하게 증가되었음이 관찰되었고, HgCl₂의 용량이 2.0 mg/kg일 때에는 임파구 분열능이 오히려 감소하여 정상 대조군보다 오히려 저하되는 결과를 보였다. 그리고 CBA 자성 마우스의 경우에는 Fig. 4에 제시된 바와 같이 HgCl₂ 0.5 mg/kg에서 LPS, Con A 모두에 대한 분열능이 정상 대조군에 비해 현저히 증가되었음이 관찰되었고, HgCl₂ 농도가 1.0~2.0 mg/kg으로 증가함에 따라 임파구 분열능은 오히려 감소하는 것으로 관찰되었다. HgCl₂의 용량이 0.5 mg/체중

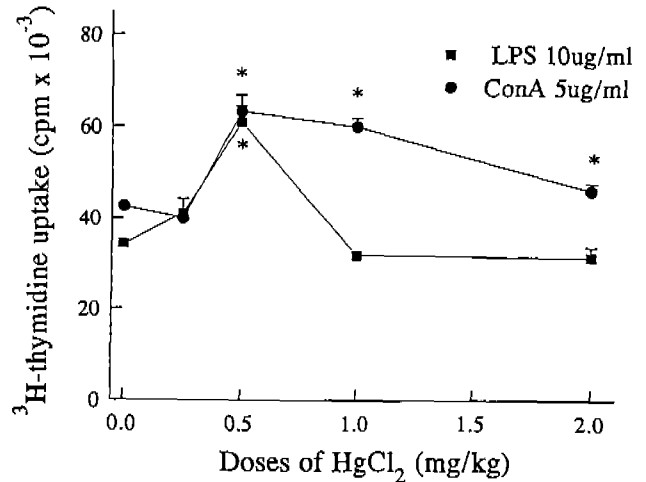


Fig. 4. Dose dependency of mitogen induced proliferation of splenocytes in CBA female mice treated with HgCl₂. Each point represents the average of 4 mice \pm SE. Significant differences from untreated group(P<0.05) are marked with an asterisk.

kg일 때 mitogen 유도 임파구 분열능이 증가한 것은 HgCl₂가 polyclonal activator로 작용한 결과라고 생각되며, 고용량에서 분열능이 저하되는 것은 용량이 과도하여 비특이적인 세포독성이 나타난 결과라고 생각된다. 이상의 결과로부터 본 실험에 사용한 마우스 종간에는 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았으며, HgCl₂의 투여용량이 높은 경우(1.0~2.0 mg/체중 kg)는 HgCl₂의 독성이 과다하여 다클론성 활성화에 의한 자가면역성 사구체 신염의 실험모델로 활용될 수 없으므로 HgCl₂의 용량은 0.5 mg/체중 kg으로 하고 실험동물은 감염성 질환에 대하여 저항성이 보다 강한 CBA 자성 마우스를 사용하는 것이

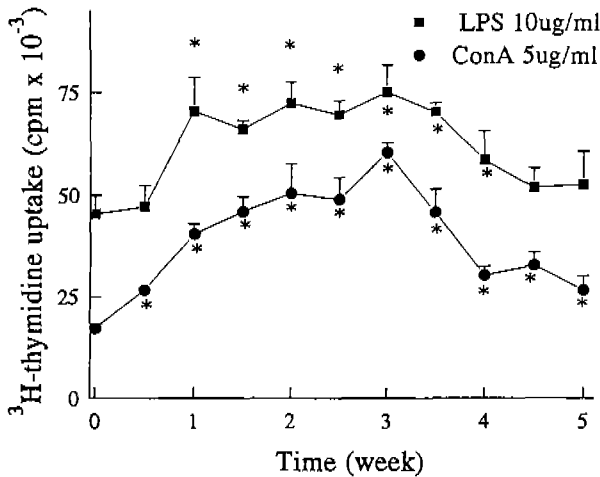


Fig. 5. Time course of mitogen induced proliferation of splenocytes in CBA female mice treated with HgCl₂(0.5 mg/kg). Each point represents the average of 4 mice ± SE. Significant differences from untreated group(P<0.05) are marked with an asterisk.

적절한 것으로 확인되었다.

HgCl₂에 의해 유발되는 다클론성 활성화에 의한 면역학적 변화가 시간의 경과에 따라 어떻게 변화되는가를 알아보고자 5주간 HgCl₂(0.5 mg/체중 kg)를 계속 투여하면서 LPS와 Con A에 의한 임파구 분열능을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 HgCl₂ 투여 시작 후 1주일째에 임파구 분열능이 현저히 증가하여 그 경향이 HgCl₂ 투여 시작 후 약 4주까지 지속되다가 감소하기 시작하여 5주째에는 거의 정상수준으로 되었다. HgCl₂를 반복적으로 장기 투여하면 신장의 실질 세포 표면에 항원공여에 관여하는 것으로 알려진 Major Histocompatibility Complex(MHC) class I과 class II의 발현이 증가된다는 사실이 보고되어 있고 이는 mRNA와 단백질 수준에서 확인되었다(Madrenas 등, 1991). MHC class I molecule은 proximal tubule cell과 endothelial cell 그리고 glomerular cell에 주로 발현되고, MHC class II molecule은 interstitial cell과 tubular cell에 발현되는 것으로 확인되었다(Madrenas 등, 1991). HgCl₂의 반복적 장기 투여에 의한 MHC molecule의 발현 증가는 HgCl₂ 투여 시작 후 1주일 이내에 최고에 달하고, 이와 같은 MHC molecule의 발현증가는 동시에 관찰되는 IFN-γ의 생성 증가가 요인이 된다. 그리고 IFN-γ의 생성 증가와 MHC molecule의 발현증가에 의해 HgCl₂의 투여 시작 2주째부터는 autoreactive T cell과 polyclonal B cell의 증가가 유도된다고 보고되어 있어 본 실험의 결과와 경향이 일치하고있다(Kammüller 등, 1989; Raynolds 등, 1993; Kubicka-Muranyi 등, 1993). 즉 HgCl₂의 투여에 의해서 autoreactive T cell이 활성화되고 이들이 분비하는 IFN-γ의 생성이 증가하여 신장에서 MHC 분자의 발현이 증가되고 T cell에 의한 자가면역반응이 심화되

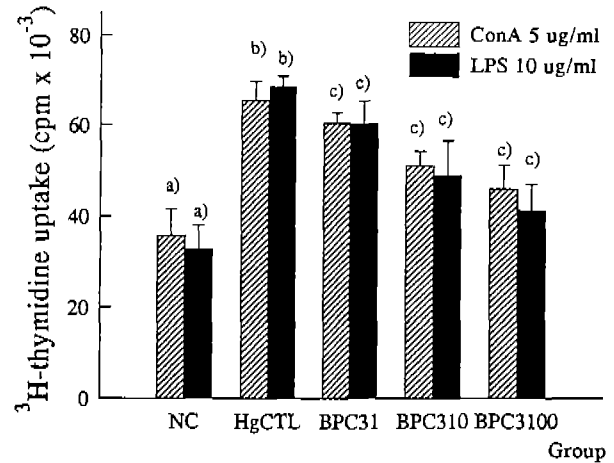


Fig. 6. Effects of the *Irpex lacteus* polysaccharide on mitogen induced proliferation of splenocytes in CBA female mice treated with HgCl₂(0.5 mg/kg). BPC31 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 31 mg/kg, BPC310 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 310 mg/kg, BPC3100 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 3100 mg/kg. Each point represents the average of 4 mice ± SE. a) vs b) P<0.05, b) vs c) 0.05.

는데 이 때 증가된 T cell의 활성이 Con A에 대한 분열능의 증가로 확인된 것이다. 그리고 LPS에 대한 분열능의 증가에서 확인할 수 있듯이 B cell도 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 그러므로 본 실험에서 확인된 HgCl₂ 투여 후 1~2주 사이에서 mitogen에 대한 임파구 분열능의 증가는 HgCl₂에 의한 autoreactive T cell activation과 polyclonal B cell activation의 결과일 것으로 생각되며 이는 본 실험에서 사용한 실험 모델이 자가면역성 사구체 신염을 유발할 수 있는 HgCl₂ 유도 다클론성 활성화의 전형적인 유형임을 확인시켜주는 결과라고 사료된다.

따라서 HgCl₂ 유도에 의한 다클론성 활성화가 유발되는 상태의 비장 임파구에 미치는 파치균 조다당의 영향을 살펴보기 위해서 HgCl₂의 작용이 시작되는 초기부터 파치균 조다당 현탁액을 경구 투여하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 HgCl₂와 파치균 조다당을 각각 투여한 후 1주일째의 임파구 분열능에 미치는 파치균 조다당의 효과는 파치균 조다당의 용량이 증가할수록 LPS와 Con A에 의한 분열능이 정상에 보다 가까운 수준을 유지하는 것이 관찰되었다.

HgCl₂를 투여하면 혈청내 항체가 증가되는 것으로 보고되어 있는데 HgCl₂ 투여 후 1~2주 사이에 혈청내에 anti-GBM IgG(Sudesh 등, 1990), IgM과 DNA binding antibody(Carol 등, 1986), collagen binding antibody(Pusey 등, 1990)의 농도가 증가되고 이로 인해 순환면역 복합체가 증가되는 것으로 알려져 있다. 또한 polyclonal B cell의 증가와 함께 비장 용혈반 형성세포수도 증가되는 것으로 보고되어 있어(Hirsch 등, 1982) 비장의

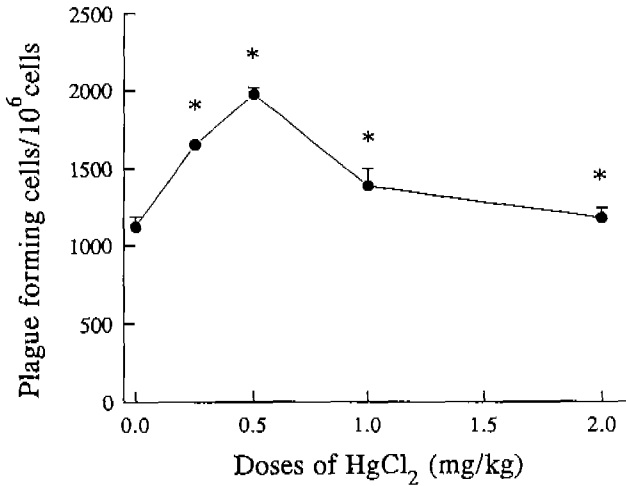


Fig. 7. Dose dependency of IgM PFC counts in CBA female mice treated with HgCl₂. Each point represents the average of 4 mice ± SE. Significant differences from untreated group (P<0.05) are marked with an asterisk.

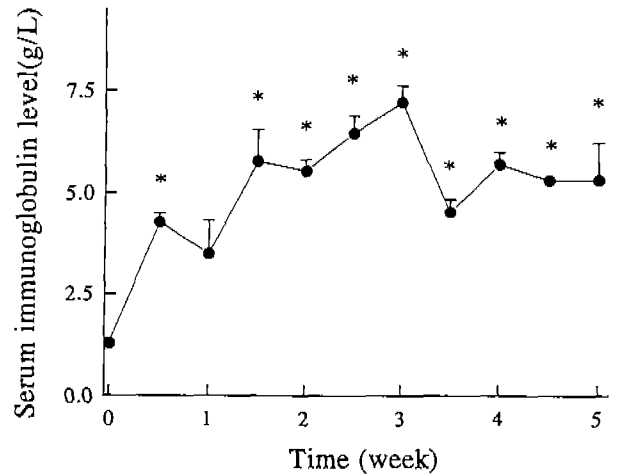


Fig. 9. Time course of the level of serum immunoglobulin in CBA female mice treated with HgCl₂(0.5 mg/kg). Each point represents the average of 4 mice ± SE. Significant differences from untreated group(P<0.05) are marked with an asterisk.

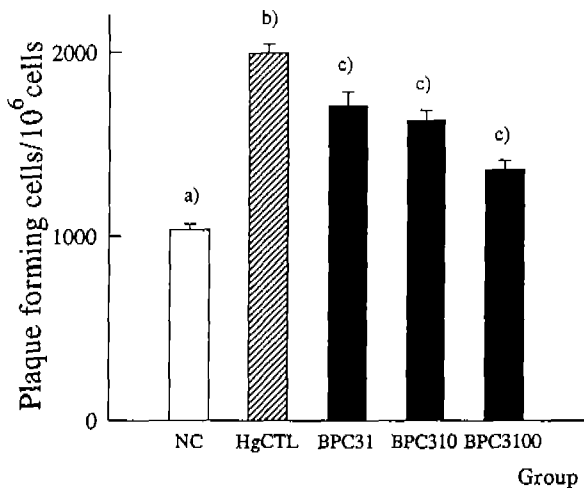


Fig. 8. Effects of the *Irpex lacteus* polysaccharide on IgM PFC counts in CBA female mice treated with HgCl₂(0.5 mg/kg). BPC31 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 31 mg/kg, BPC 310 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 310 mg/kg, BPC3100 : HgCl₂ 0.5 mg/kg+extracts 3100 mg/kg. Each point represents the average of 4 mice ± SE. a) vs b) P<0.05, b) vs c) 0.05.

용혈반 형성세포수를 측정하여 보았다. Fig. 7에서 제시된 바와 같이 HgCl₂ 투여 용량을 달리하여 용혈반 형성세포를 측정한 결과 HgCl₂(0.5 mg/체중 kg) 투여시에 용혈반 형성세포가 현저히 증가되어 있음이 관찰되었고 HgCl₂(0.5 mg/kg)를 투여하는 마우스에 파치균 조다당을 투여한 결과(Fig. 8) 용혈반 형성세포 수의 증가가 억제되어 파치균 조다당 3100 mg/kg을 투여한 군에서는 정상 대조군과 유사한 수치를 나타내었다. 즉 HgCl₂ 투여군은 정상대조군에 비해 B cell 기능이 전반적으로 항진되어 있으며 파치균 조다당은 이를 정상수준에서 억제하고

있음이 관찰되었다 이상의 결과를 종합하여 보면, HgCl₂ (0.5 mg/kg)의 투여 시작 1주일후부터 mitogen 유도 임 파구 분열능이 증가하여 3주 이상까지 지속되었으나 파치균 조다당을 투여한 군에서는 정상 수준으로 억제되었고 용혈반 형성세포수 역시 정상 대조군에 비해 HgCl₂ 단독 투여군에서 현저히 증가되었으나 파치균 조다당 투여에 의해 정상 상태가 유지되었다. HgCl₂ 투여상태에서 T cell의 반응성이 증가되는 것이 대부분 autoreactive T cell에 의하기 때문에 파치균 조다당에 의해 T cell 반응성이 억제되는 것은 autoreactive T cell의 활성이 조절되기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 이러한 파치균 조다당의 면역조절작용은 MHC 분자의 발현을 증가시켜서 자가면역반응을 항진시키는 T cell 유래의 IFN-γ와 HgCl₂ 투여에 의해 증가되는 immunoglobulin인 IgG1, IgE 등의 생성을 증가시키는 것으로 알려진 (Ochel 등, 1991) IL-4 등의 cytokine 분비를 억제하거나 mitogen 자극 이후 cell내 신호전달 과정을 차단하기 때문에 나타나는 현상으로 생각된다. 그리고 파치균 조다당은 B cell의 polyclonal activator인 LPS에 대한 반응성과 용혈반 형성세포수의 증가를 억제시켰는데 이는 파치균 조다당이 B cell의 분열과 항체 생성능을 조절하는 면역조절활성을 갖기 때문이다.

이상의 결과와 같은 파치균 조다당의 면역활성이 자가면역성 사구체 신염 등의 자가면역질환을 유발할 수 있는 Ig의 생성에 영향을 주는 지를 확인 하기 위하여 혈중 Ig를 정량하였다. 먼저 HgCl₂(0.5 mg/kg 체중)를 투여하면서 혈중 Ig의 경시적 변화를 살펴보았다. Fig. 9에서와 같이 HgCl₂를 투여함에 따라 혈중 Ig의 양이 2~3주에서 최대로 증가하였고 이후 약간 감소하였으나 정상보다 유의적으로 높은 수치를 유지하였다. 그리고

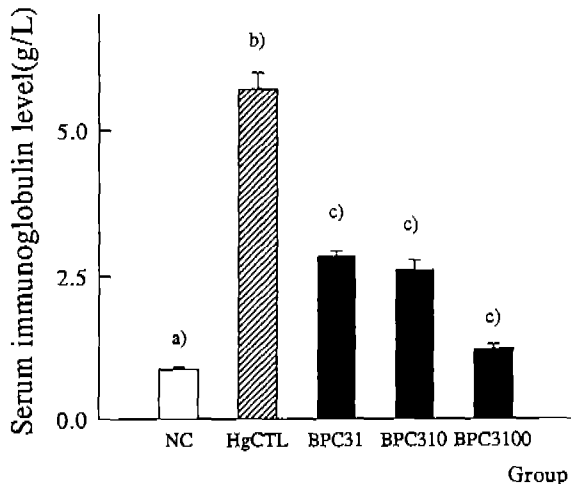


Fig. 10. Effects of the *Irpex lacteus* polysaccharide on the serum immunoglobulin level in CBA female mice treated with HgCl_2 (0.5 mg/kg). BPC31 : HgCl_2 0.5 mg/kg+extracts 31 mg/kg, BPC310 : HgCl_2 0.5 mg/kg+extracts 310 mg/kg, BPC 3100 : HgCl_2 0.5 mg/kg+extracts 3100 mg/kg. Each point represents the average of 4 mice \pm SE. a) vs b): $P < 0.05$, b) vs c): 0.05.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 파치균 조다당을 HgCl_2 와 병행하여 투여하였을 때 혈중 Ig의 증가가 억제되었고 파치균 조다당의 용량이 3100 mg/kg 체중에서 최대의 억제효과(저해율 : 92%)를 나타내었다. 결론적으로 HgCl_2 를 투여하여 T cell과 B cell의 활성이 증가함에 따라 사구체에 침착하여 자가면역성 사구체 신염을 유발하는 혈중 Ig의 양이 증가하고 파치균 조다당을 투여함으로써 T cell과 B cell의 활성증가가 억제되고 혈중 Ig의 증가 역시 억제 된다는 사실로 보아 파치균 조다당의 면역조절효과가 HgCl_2 에 의한 다클론성 활성화에 의해 증가되는 Ig와 순환 면역복합체의 침착에 의해 유발되는 자가면역성 사구체 신염의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

C. D., Pusey, C., Bowman, A., Morgan, A. P., Weetman, B., Hartley and C. M. Lockwood. (1990). Kinetics and Pathogenicity of autoantibodies induced by mercuric chloride in

- the Brown Norway Rat. *Clin. Exp. Immunol.* **81**, 76-82.
- Carol, J., Goter Robinson, Tibor Balazs, and Igor K. Egorov (1986). Mercuric chloride-, Gold sodium thiomalate-, and D-Penicillamine-induced antinuclear antibodies in mice. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* **86**, 159-169.
- Francois Hirsch, Jacques Couderc, Catherine Sapin, Gilbert Fourie and Philippe Druet. (1982). Polyclonal effect of HgCl_2 in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* **12**, 620-625.
- Goldman et al (1988). Polyclonal activation and experimental nephritis. *Kidney international* **34**, 141-150.
- Joaquin Madrenas, Nollaig A. Parfrey and Philip F. Halloran (1991). Interferon gamma-mediated renal MHC expression in mercuric chloride-induced glomerulonephritis. *Kidney International* **39**, 273-281.
- John Reynolds, Beverley A. Salline, Christos Syrganis and Chales D. Pusey (1993). The Role of T-helper Lymphocytes in Priming for Experimental Autoimmune Glomerulonephritis in the BN Rat. *J. Autoimmunity* **6**, 571-585.
- M. E. Kammüller, N. Bloksma and W. Seinen (1989). Autoimmune reactions induced by metals. In *Autoimmunity and toxicology* (M. E. Kammüller, N. Bloksma and W. Seinen Ed.). pp347-390. Elsevier, Amsterdam.
- Malgorzata Kubicka-Muranyi, Olaf Behmer, Markus Uhrberg, Hanne Klonowski, Joachim Bister and Ernst Gleichmann (1993). Murine Systemic Autoimmune disease induced by Mercuric Chloride (HgCl_2): Hg-specific Helper T-Cells React to Antigen Stored in Macrophages. *Int. J. Immunopharmac.* **15**(2), 151-161.
- Martina Ochel, Hans-Werner Vohr, Christiane Pfeiffer and Ernst Gleichmann (1991). IL-4 Is Required for the IgE and IgG1 Increase and IgG1 Autoantibody Formation in Mice Treated with Mercuric Chloride. *J. Immunol.* **146**(9), 3006-3011.
- P. Hutman & S. Enestrom (1987). The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride : strain dependent susceptibility. *Clin. exp. Immunol.* **67**, 283-292.
- Sandra M. Cockfield, Vido Ramassar, Joan Urmson and Philip F. Halloran (1989). Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC expression in mice by triggering T cells to release $\text{INF-}\gamma$. *J. Immunol.* **142**, 1120-1128.
- Sudesh P. Makker and John J. Kanalas (1990). Renal antigens in mercuric chloride induced, anti-GBM autoantibody glomerular disease. *Kidney International* **37**, 64-71.
- 張琦 등 (1984). 齒菌多糖對抗體免疫功能的影響 長春中醫學院報 22-28.