

Simazine이 복강 대식세포의 기능에 미치는 영향

김경란 · 손은화 · 이동권 · 표석능*
성균관대학교 약학대학

Inhibitory Effects of Simazine on Various Functions of Peritoneal Macrophages

Kyung-Ran KIM, Eun-Hwa SON, Dong-Kwon RHEE and Suhkneung PYO*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon City, Kyunggi-do 440-746, Korea

(Received October 16, 2002 ; accepted November 30, 2002)

Abstract – Triazine herbicide has been reported to directly suppress the immune response. In the present study, we examined various functions of murine peritoneal macrophages that were isolated and stimulated with LPS after simazine (300 and 600 mg/kg body weight), a triazine herbicide, was administered every day for 4 weeks. Simazine decreased the capacity of phagocytosis, compared to those of carboxymethylcellulose (CMC)-treated control group. In addition, the production of NO and TNF- α was decreased in macrophages of simazine-treated mice. However, the production of hydrogen peroxide (H_2O_2) was not altered. In vitro tumoricidal activity of in vivo simazine-treated macrophages was reduced against target cell, B16 melanoma. Taken together, these results suggested that simazine might have the immunosuppressive effect on macrophages after in vivo exposure, which was related to the reduction of tumoricidal activity.

Key words □ Simazine, macrophage, H_2O_2 , TNF- α , NO, tumoricidal activity

Simazine은 triazine계 herbicide로서 동물에서 유방암이나 다른 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Hayes 등, 1990). 또한 triazine계 herbicide인 atrazine이 면역계에 억제효과가 있음이 보고 되어왔고(Michel 등, 1992), simazine 및 atrazine과 같은 제초제를 포함한 많은 농약들이 면역계에 미치는 영향에 대한 연구가 계속되어지고 있으며 대식세포와 환경오염 화학물질의 상호작용이 연구 보고 되었다(Lewis & Adams, 1985; Adams 등, 1988). 환경오염 화학물질에 노출은 숙주방어에 중요한 역할을 하는 대식세포의 기능을 저해하여 감염에 대한 숙주저항력을 감소시킬 수 있다. 이와 같은 숙주저항력의 감소는 일반적인 면역계, 특히 대식세포에 미치는 환경오염 화학물질의 영향에 대한 수많은 연구에서 강조되고 있다(Lewis & Adams, 1985). 또한 산화물과 독성물질의 분비와 같은 대식세포 기능의 향상이나 조절 저하는 주위의 조직이나 세포에 손상을 초래 할 수도 있다. 대식세포와 호중구 같은 염증반응에 관여하는 세포들에 의해 유도되는 2차적인 손상은 체내독성 뿐만 아니라 환경오염 화학물질의 발암성에도 중요한 역할을 한다(Kensler 등, 1983; Lewis & Adams, 1987). 대식세포에 대한 환경오

염 화학물질의 영향은 대부분 대식세포의 활성상태를 변화시키거나 또는 활성신호에 반응하기 위한 대식세포의 능력을 변화시킬 수 있다고 추정 되어진다(Lewis and Adams, 1985; Adams 등, 1988). 만약 활성화 상태가 변경되고 적절한 자극에 대한 반응에서 서로 다른 활성화 단계를 획득할 능력이 영향을 받는다면 전체적인 기능이 향상 될 수도 있고 저하될 수도 있다. 이와 같은 보고들에도 불구하고 이미 발표된 다양한 환경오염 화학물질들의 면역억제작용 평가가 대부분 특이성면역인 획득면역에 미치는 영향에 관심을 집중시켰으나 최근 들어 선천성자연면역에 미치는 영향에 관심이 높아지고 있으므로 본 연구는 환경오염 화학물질의 면역억제효과를 보고한 이전의 연구를 참고로 하여 비특이적 및 특이적 면역반응에서 중요한 역할을 하는 대식세포를 이용하여 simazine이 면역반응에 미치는 영향을 평가하였다.

실험방법

실험동물과 시약

본 연구에 사용된 실험동물은 체중 20-25 g의 7-8주령 자성 C57/BL6계 생쥐를 Charles River Lab. (Japan)으로부터 분양 받아 실험하였다. 순도 96%의 simazine을

*To whom correspondence should be addressed.

0.5% carboxymethylcellulose (CMC)에 녹여서 실험군(6마리)에 300 mg/kg 또는 600 mg/kg body weight로 4주 동안 투여하였다. Simazine을 투여하지 않은 군과 CMC만을 투여한 군을 대조군으로 하였다. 투여용량과 투여기간은 다른 실험자의 발표된 실험결과를 이용하여 정하였다(Fournier 등, 1992; Eldrige 등, 1994). 0.5% CMC 용액은 colloid 형태이므로 완전히 녹이기 위해 37°C incubator에서 swelling 시켜서 사용하였다. 모든 시약은 특별한 언급이 없으면 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며 RPMI 1640와 FBS는 미국의 Gibco사(Grand Island, NY)에서 구입하여 사용하였다.

복강대식세포의 분리와 배양

Thioglycollate를 이용하여 염증성 대식세포를 얻기 위하여 1 ml의 thioglycollate를 복강으로 투여하고 3-4일 후 5 ml의 배지(RPMI 1640)를 복강으로 주사하여 잘 흔들어 다시 주사기로 유출한다. 복강 유출세포로부터 대식세포를 분리하는 것은 Pyo 등(1993)이 서술한 방법으로 분리하였다. 요약해서 설명하면 유출된 복강세포는 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 10% FBS 함유하고 100 IU/ml의 penicillin과 100 µg/ml의 streptomycin을 포함한 RPMI 1640에 현탁한 후 teflon-coated petridish (100×15 mm)에 5-6×10⁵ cells/cm²로 분주하여 대식세포가 바닥에 부착되도록 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2-3시간 배양하고 petridish에 부착하지 않은 세포는 10 ml의 배지로 2번 수세하여 제거한 후 4°C에서 10분간 더 배양하였다. 상등액을 제거한 후 D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Solution) 5 ml로 한번 더 수세하고 1.5% FBS 함유 D-PBS 15 ml를 가한 후 0.3 ml의 0.1 M EDTA (pH 7.0)를 방울방울 첨가하여 상온에서 15분간 배양하였다. 10 ml 주사기를 사용하여 바닥에 붙어있는 대식세포를 떼어 내어서 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 분리된 대식세포를 원하는 농도로 희석하였다.

LPS에 의한 대식세포 처리

분리한 복강대식세포를 96 well plate (Costar Products, Cambridge, MA)에 1×10⁵ cells/well의 농도로 넣고 2시간 배양 후 비부착세포를 제거하였다. 24 시간 동안 LPS (1 µg/ml)로 자극한 후 대식세포의 다양한 기능에 대한 simazine의 효과를 측정하기 위해 필요한 실험을 하였다.

암세포 사멸능력 측정

B16 흑색종암세포(ATCC, Rockville, MD)에 대한 대식세포의 항암효과를 측정하기 위해 96 well에 대식세포를 1×10⁵ cells/well의 농도로 넣고 표적세포인 B16 흑색종

암세포를 1×10⁴ cells/well이 되도록 가하고 18시간동안 배양하였다. MTT (2 µg/ml) 25 µl를 가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 Molecular Device microplate reader (Menlo, CA)로 540 nm에서 측정하여 암세포 사멸능을 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ of control} = 100 - \left[\frac{\text{OD}(\text{macrophage} + \text{tumor target}) - \text{OD}(\text{macrophage})}{\text{OD}(\text{tumor target})} \right] \times 100$$

TNF-α 생성 측정

앞에서 서술한 방법으로 분리한 대식세포를 18 시간 동안 배양한 후, 배양 상등액중의 TNF-α 생성측정을 TNF-α에 민감한 L929세포를 이용하여 실시하였다(Mand 등, 1991). L929 (1×10⁴ cells) 100 µl을 96 well plate에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거하고 시료와 함께 50 µl RPMI 1640 배양액과 50 µl actinomycin D (2 µg/ml)을 가한 후, 18시간 동안 더 배양하고 MTT (5 mg/ml) 25 µl를 가하였다. 4시간 동안 배양한 후 DMSO 150 µl씩 가하고 생성된 formazan이 녹을 때 까지 혼합한 뒤 microplate reader 을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Murine TNF-α (Genzyme, Cambridge, MA)을 이용하여 만든 표준곡선으로부터 검체의 TNF-α 양을 측정하였다.

NO의 생성도 측정

대식세포가 항암 효과를 나타내는 기전의 하나인 NO 생성에 대한 simazine의 영향을 알아보기 위하여 앞에서 서술한 방법으로 분리한 대식세포를 18시간 배양시킨 후 배양상등액 중의 NO 생성 농도를 Ding 등(1988)의 방법에 따라서 측정하였다. 100 µl의 배양상등액을 취하여 96-well plate에 옮긴 후 각 각의 well에 100 µl의 Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 NaNO₂를 사용하여 작성한 표준곡선을 사용하여 계산하였다. Griess reagent는 중류수에 녹인 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride와 5% H₃PO₄ 용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용 직전에 만들어 사용하였다.

탐식작용의 측정

대식세포의 탐식능력은 Okimura 등(1986)의 zymosan particle 도입 방법을 수정하여 NBT (Nitro Blue Tetrazolium) reduction 방법을 이용하여 측정하였다. 앞에서 서술한 방법으로 분리한 대식세포에 5×10⁵ particles/ml의 zymosan과 0.6 mg/ml NBT를 가하여 zymosan 과 함께 NBT 시약이 uptake 되도록 1시간 배양하였다. 차가운 생

리식염수로 수세한 후 NBT 환원물질인 청보라색의 불용성 formazan의 생성정도를 알아보기 위하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Hydrogen peroxide 생성 측정

Hydrogen peroxide (H_2O_2)의 분비는 지시약인 phenol red의 색이 horse-radish peroxidase의 촉매하에 산화되어 변하는 정도로 측정할 수 있는데 이는 Nathan과 Root (1977)가 언급한 방법을 변형하여 사용하였다. 앞에서 서술한 방법으로 분리한 대식세포에 50 μ l의 zymosan 1 μ g/ml 넣고 1시간 uptake시킨 후 50 μ g/ml의 horseradish peroxidase 100 μ l와 50 μ l의 phenol red를 가하고 1시간 더 배양시킨 후 microplate reader로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 주어진 실험조건하에서 흡광도의 감소는 생성된 H_2O_2 의 양과 비례하는데 결과는 투여군의 흡광도 감소를 대조군의 흡광도 감소와 비교하여 나타내었다.

통계처리

대조군과 실험군의 실험결과에 대한 통계학적 분석은 student-t test를 이용하여 p값이 0.05 이하인 것을 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

결과 및 고찰

Simazine(2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-1,3,5-triazine)은 주요 농작물을 재배하는데 잡초 제거에 세계적으로 가장 흔하게 사용되는 triazine계 제초제 중의 하나이다. Simazine은 낮은 용해성에도 불구하고 이 제초제의 잔류물이 수면과 지하수 공급처에서 쉽게 발견된다. 그러므로 농장주와 소비자는 모두 제초제를 사용하는 동안 직접적으로 노출될 뿐만 아니라, 음용수와 음식섭취를 통해 simazine에 간접적으로 노출될 수 있다. 지금까지 연구된 자료에 의하면 triazine계 제초제가 면역반응에 미치는 영향에 대한 보고는 매우 적다. Fournier 등(1992)은 atrazine이 체액성 면역과 세포성 면역에 영향을 미친다고 발표했고, 다른 연구는 장기간의 simazine의 투여가 T세포의 기능을 억제하고 호중구의 식작용을 억제하였다는 보고가 있었다(Barshtein 등, 1991). 최근에 본 연구팀은 *in vitro*에서 simazine을 처리했을 때 대식세포에 의한 항바이러스 작용과 세포독성작용을 억제하고, 대식세포의 NO, TNF- α , IFN 분비를 감소시키는 결과를 보여주었다(Kim 등, 2002). 그러나 simazine의 생체내(*in vivo*) 대식세포 기능에 대한 연구는 없으며, 본 연구팀에서 사용했던 제초제에 대한 전반적인 생체내 영향도 아직 평가되지 않았다. 따라서 본 연구는 simazine을 마우스에

직접 투여하여 대식세포기능에 미치는 영향을 평가하였으며, 연구 결과에 의하면 simazine의 장기간(4주) 경구 투여가 면역독성효과의 가능성을 제시하였다.

동물에 simazine을 투여한 후 복강대식세포 기능의 변화를 알아보기 위해 thioglycollate로 자극하여 실험 방법에서 서술한대로 대식세포를 분리하였다. 대식세포의 탐식작용은 외부물질에 대한 일차적인 방어기전으로 알려져 있다. Simazine을 투여한 군에서 대조군에 비해 300 mg/kg 및 600 mg/kg 농도에서 22%와 27% 각각 감소하였다(Fig. 1). 이러한 결과는 simazine이 다양한 매개물질의 생성을 위해 세포생존에는 영향을 주지 않으면서 대식세포의 기능에 손상을 줄수 있다는 것을 의미한다. 또한 대식세포에서 분비되는 세포독성 물질인 NO 및 H_2O_2 생성, TNF- α 생성에 대한 효과를 측정하였는데 NO 생성은 대조군에 비해 투여한 저농도와 고농도에서 각각 15%와 23% 정도 감소하였다(Fig. 2a). 이와는 반대로 H_2O_2 생성은 통계학적 유의성은 없으나 simazine에 의해 대조군에 비해 약간 증가하였다(Fig. 2b). 이러한 결과는 대식세포의 독성물질 생성에 대하여 simazine이 다르게 작용하는 것 같다. Simazine을 투여한 군에서 분리한 대식세포에서 TNF- α 생성은 약 24%와 39% 각각 감소하였다(Fig. 2c). 이러한 결과는 simazine을 동물에 투여하였을 때 대식세포의 기능이 억제된다는 것을 확인하였으며 이와 같은 대식세포에 대한 영향은 대식세포의 활성 상태를 변화시키거나 또는 활성신호에 반응하기 위한 대

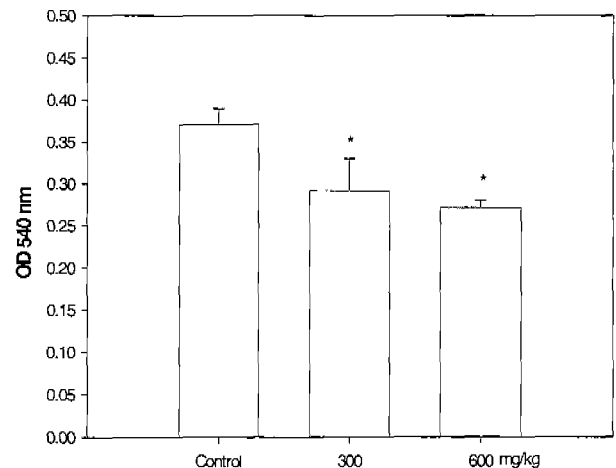


Fig. 1. Effect of simazine exposure on phagocytosis of macrophages. 300 or 600 mg/kg body weight of simazine was administered by oral gavage to mice every day for 4 weeks. Peritoneal macrophages were isolated on the 1st day after the last administration of simazine. Phagocytosis was measured as OD 540 nm following NBT assay. * $P < 0.05$; significantly different from the vehicle control group. Experiments were repeated 2 times.

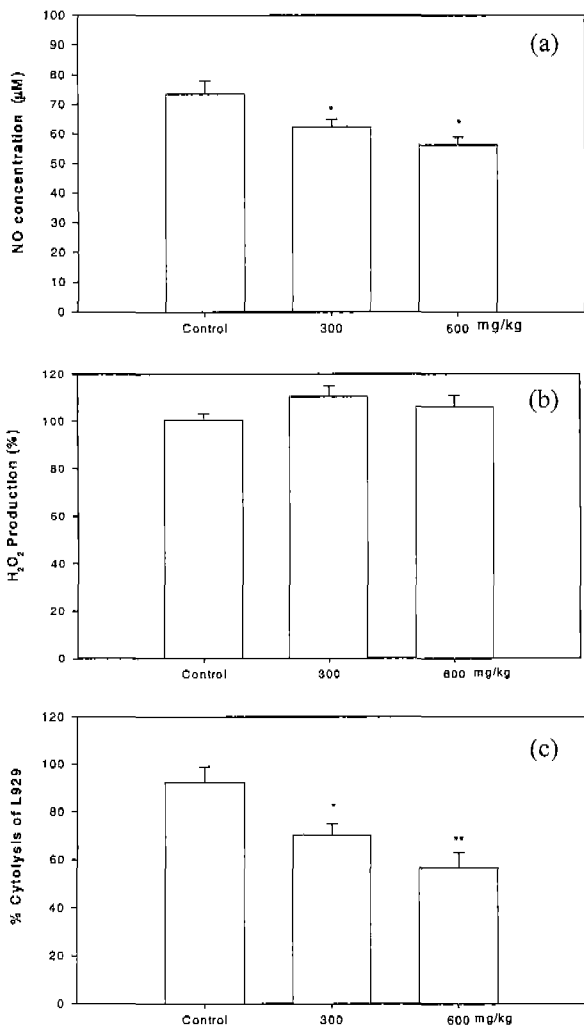


Fig. 2. Effect of simazine exposure on NO (a), H₂O₂ (b) and TNF- α (c) production of macrophage. 300 or 600mg/kg body weight of simazine was administered by oral gavage to mice everyday for 4 weeks. Peritoneal macrophages were isolated on the 1st day after the last administration of simazine. Culture supernatants of macrophages were collected and the levels of nitrite, H₂O₂ and TNF- α were measured as described in materials and method. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from the vehicle control group. Experiments were repeated 2 times.

식세포의 기능을 변화시킬 수 있다고 사료된다.

또한 simazine 투여가 대식세포의 항암작용을 변화시키는지를 알아보기 위해 simazine을 투여한 생쥐로부터 분리한 대식세포를 LPS로 18시간동안 처리하였다. 대식세포의 암세포 사멸능은 대조군에 비해 20% 및 37% 각각 감소하였다(Fig. 3). 더구나 simazine을 마지막으로 투여한 후 7일 지난 다음 분리한 대식세포의 생성물과 암세포 사멸능이 회복되지 않고 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(data not shown). 따라서 simazine은 지속적이며

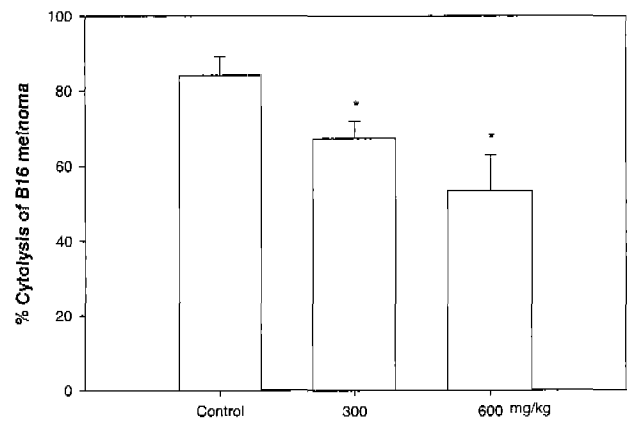


Fig. 3. Effect of simazine exposure on antitumor activity of macrophages. 300 or 600mg/kg body weight of simazine was administered by oral gavage to mice everyday for 4 weeks. Peritoneal macrophages were isolated on the 1st day after the last administration of simazine. Macrophages were co-incubated with B16 melanoma for 18 h at effector: target ratio of 10: 1 and tumoricidal activity was assessed by MTT assay. *P<0.05, significantly different from the vehicle control group. Experiments were repeated 2 times.

비가역적으로 대식세포의 기능을 억제한다고 할 수 있다.

Stuehr와 Marett (1985)는 활성화된 복강대식세포를 LPS와 IFN- γ 로 처리하였을 때 NO₂⁻와 NO₃⁻를 생성된다고 최초로 보고 하였다. NO는 L-arginine의 활성생성물질이며 짧은 시간내에 respiratory burst와 상관없이 불활성물질인 nitrite와 nitrate로 전환된다(Iyengar 등, 1987). 또한 NO는 표적세포의 철을 함유한 효소를 억제하여 대식세포의 암세포 사멸과 세균 사멸 작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Keller & Keist, 1987). 활성화한 대식세포에서 분비되는 TNF- α 또한 암세포를 죽이는 중요한 물질이라고 많이 발표되었다(Feinman 등, 1987). 따라서 simazine에 의해 억제되는 대식세포의 암세포 사멸작용은 감소된 TNF- α 와 NO의 생성에 기인되는 것으로 추정되며, 이러한 결과는 분비물질이 암세포 사멸 효과에서 중요한 역할을 한다는 예전의 보고와 일치 된다(Bredt & Snyder, 1994; Feinman 등, 1987; Urban 등, 1986). 그러나, simazine에 의해 억제되는 대식세포의 암세포 사멸작용 기작은 확실히 규명되지 않았다. DiNapoli 등(1996)은 암세포를 이식한 동물로부터 분리한 대식세포가 NO를 생성하고 표적세포를 사멸하는 능력이 감소되는 원인은 iNOS 발현이 감소되기 때문이라고 발표하였으며, 또한 본 연구의 실험결과는 최근에 본 연구실에서 발표된 실험관내에서 simazin을 대식세포에 처리한 결과와 일치한다(Kim 등, 2002).

본 실험결과로부터 simazine에 의해 대식세포의 기능이

억제되는 가능한 작용 기작은 첫째, simazine이 직접적으로 대식세포의 기능을 억제할 수 있다. Simazine의 대사산물이 매우 활성적이기 때문에 세포의 활성화 후 대식세포는 simazine 또는 그 대사산물을 세포내 축적할 가능성이 있다. Hanioka 등(1999)은 cytochrome P450 system에 의해 simazine이 2-chloro-4 ethylamino-6-amino-1,3,5-triazine로 전환된다고 하였다. 둘째, simazine 투여군에서 대식세포의 전구세포(GM-progenitor cell)가 대식세포로의 분화가 정상적으로 이루어지지 않기 때문에 간접적으로 이 제초제에 대한 일반적인 세포 반응을 하지 못할 수가 있다. 셋째, 대식세포 기능에 대한 활성 신호 전달이 simazine에 의해 방해 또는 억제 될 수가 있다. 이러한 가능성에 대해서는 더 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론적으로 simazine은 세포사멸능, 탐식작용, TNF- α 와 NO 등 대식세포의 기능을 억제한다. 이러한 연구결과는 대식세포가 암세포에 일차적인 주요 면역세포인 것을 재확인하였으며 대식세포의 감소된 세포사멸능은 TNF- α 와 NO 생성의 감소와 밀접한 연관성이 있는 듯하다. 또한 simazine과 triazine 계 제초제의 면역계에 미치는 영향에 대한 정보를 제공하며 simazine의 면역억제작용의 작용기전을 밝히는데 도움이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Adams, D.O., Lewis J.G., and Dean J.H. (1988). Activation of mononuclear phagocytes by xenobiotics of environmental concern. Analysis and host effects. In Gardner D.E., Crapo J.D. and Massaro E.J. (Eds.), Toxicology of the Lung, Raven Press, New York, pp. 351-373.
- Barshtein, I.A., Pali, G.K., Persidskii, I.V., Ben'iaminov, V.O., and Pushkar, M.S. (1991). Immunomorphological analysis of prolonged intoxication by low doses of herbicide simazine. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 112, 657-659.
- Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 175-195.
- DiNapoli, M.R., Calderon, C.L., and Lopez, D.M. (1996). The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduced expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Exp. Med.*, 183, 1323-1329.
- Ding A.H., Nathan C.F. and Stuthr D.J. (1988). Release of reactive oxygen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, 141, 2407-2412.
- Eldrige, J.C., Gleenor-Heyser, D.G. and Extrom, P.C. 1994. Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 43, 155-167.
- Feiman, R., Henriksen-DeStefano, D., Tsujimoto, M., and Vilcek, J. (1987). Tumor necrosis factor is an important mediator of tumor cell killing by human monocytes. *J. Immunol.*, 138, 635-640.
- Fournier, M., Friborg, J., Girard, D., Mansour, S., and Krzytyniak, K. (1992). Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice. *Toxicol. Lett.*, 60, 263-274
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., and Ando, M. (1999). *In vitro* metabolism of simazine, atrazine and propazine by hepatic cytochrome P450 enzymes of rat, mouse and guinea pig, and oestrogenic activity of chlorotriazines and their main metabolites. *Xenobiotica*, 29, 1213-1226.
- Hayes, W.J. and Laws, E.R. (eds.), (1990). Handbook of Pesticide Toxicology 3, Classes of Pesticides, Academic Press, New York.
- Iyengar, R., Stuer, D.J., and Maretta, M.A. (1987). Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamine: recursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6369-6373.
- Keller, R. and Keist, R. (1989). Abilities of activated macrophages to manifest tumoricidal activity and to generated reactive nitrogen intermediates: A comparative study *in vitro* and *ex vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 164, 968-973.
- Kensler, T.W. and Trush, M.A. (1983). Inhibition of oxygen radical metabolism in phorbol ester-activated polymorphonuclear leukocytes by an antitumor promoting copper complex with superoxide dismutase-mimetic activity. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 3485-3487
- Kim, K.R., Son, E.W., Rhee, D.K., and Pyo, S. (2002). The immunomodulatory effects of the herbicide simazine on murine macrophage functions *in vitro*. *Toxicol. in vitro*, 16, 33-39.
- Lewis, J.G. and Adams, D.O. (1987). Inflammation, oxidative DNA damage and carcinogenesis. *Environ. Health Persp.*, 76, 19-27.
- Lewis J.G. and Adams D.O. (1985). The mononuclear phagocyte system and its interaction with xenobiotics. In Dean J.H., Luster M.I., Muson A.E. and Amos H. (Eds.), Immunotoxicology and Immunopharmacology, Raven Press, New York, pp. 23-44.
- Mand, H.M. and Vogel, S.N. (1991) Measurement of mouse and human TNF: In Colgan, J.E., Krusbeek, A.M., Shevach, E.M., and Strober, W. (Eds) Current Protocols in Immunology, Wiley-Interscience, New York, pp 6.10.1-6.10.5
- Michel F., Jacques F., Denis G., Saad M., and Krzyztof K. (1992). Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) *in mice*. *Toxicol. Lett.*, 60, 263-274.
- Nathan, C.F. and Root, R.K. (1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: Dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med.*, 161, 648-662.
- Okimura, T., Ogawa, M. and Yamauchi, T. (1986). Stress and immune responses. III. Effect of restraint stress on delayed

- type hypersensitivity (DTH) response, natural killer (NK) activity and phagocytosis in mice. *Japan, J. Pharmacol.*, 41, 229-235.
- Pyo, S., Gangemi, J.D., Ghaffer, A., and Mayer, E.P. (1993). Poly I:C-induced antiviral and cytotoxic activities are mediated by different mechanisms. *Int. J. Immunopharmac.*, 15, 477-486.
- Stuehr, D.J. and Marletta, M.A. (1985). Mammalian nitrate biosynthesis. Mouse macrophage produce nitrate and nitrite in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7738-7742.
- Urban, J.L., Shepard, H.M., Rothstein, J.L., Sugarman, B.J., and Shreiber, H. (1986). Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5233-5237.