

Hydrocortisone 이 胸腺細胞에 미치는 影響

全南大學校 醫科大學 細菌學教室

河 大 有

= Abstract =

Effect of Hydrocortisone on Thymus Cells

Tai-You Ha, M.D.

Department of Microbiology, Chonnam University Medical School, Korea

On day 2 after treatment of Lewis rat with 25mg of hydrocortisone, the cell number in the thymus was reduced to less than 10% of the matched control. By day 12 after hydrocortisone treatment the thymic cell population was recovered almost its original value and on day 24 after treatment the number of thymocytes was equivalent to that of normal thymocytes.

The density distribution profile of hydrocortisone treated rats as compared with normal rats showed a marked decrease in the denser fraction D while the lighter fractions. (A plus B, and C) showed a considerable proportional increase.

The proportion of dead cells in thymus suspension from hydrocortisone treated rats was higher than that from their normal counterparts. On separation, the dead cells accumulated selectively in the pellet and A fraction.

The response of the thymocytes from hydrocortisone treated rats to PHA was increased compared to that from normal rats. Among the subpopulations, D fraction, which was relatively unresponsive in normal rats, showed a marked increase in PHA response and C fraction showed some increase in the response.

Corticosteroid를 注射받은 動物이나 사람은 體液性 免疫과 細胞性免疫이 抑制되어 正常動物에 비해 微生物에 對한 感受성이 增加된다¹⁾. 動物과 사람이 Stress를 받으면 Corticosteroid가 分泌되어 이들 生體는 免疫反應이 抑制된다. 大量의 Steroid는 모든 淋巴樣組織에 있는 淋巴球를 파괴하여 淋巴球減少症을 일으킨다. 특히 免疫系의 中樞器官인 胸腺은 Steroid 効果에 感受성이 다²⁾.

最近 Cortisone에 耐性を 나타내는 淋巴球가 있다는 것이 報告되었다. Warner³⁾는 닭을 對象으로, Blomgren

等⁴⁾ 및 Cohen等⁵⁾은 Mouse를 對象으로 한 實驗에서 胸腺의 髓質細胞는 Cortisone과 hydrocortisone(HC)에 耐性이며, 이 HC 耐性細胞는 Graft-vs-Host反應을 일으킬 수 있다고 報告하였다. Cohn等⁶⁾ 그리고 Blomgren⁷⁾은 HC 耐性 胸腺細胞는 helper-cell Activity가 있다고 報告하였으며 Vischer⁸⁾ 및 Blomgren等⁹⁾은 HC 耐性胸腺細胞도 Phytohemagglutinin (PHA)에 反應한다고 報告하였다. 著者等¹⁰⁾은 위에 있어서 胸腺免疫抑制細胞(thymic suppressor cell)의 一部가 HC에 耐性임을 究明하였다.

림바구刺戟은 胸腺由來림바구(T細胞)와 骨髓由來림바구(B細胞)의 機能을 研究하는데 廣範圍하게 利用되고 있다. 따라서 이번엔 HC 耐性胸腺細胞와 그 Subpopulation의 PHA 刺戟에 對한 反應을 알아보고자 本實驗을 實施하였다.

實驗材料 및 方法

Hydrocortisone 感受性檢査: 生後 8~10週의 Lewis Rat(體重 170~220 mg, 수컷 Microbiological Associates, Inc., Bethesda, Md.)를 使用하였다. 各 動物에 hydrocortisone Acetate (HC, Nutritional Biochemicals Corp.) 25 mg를 腹腔에 1回 注射하였다. HC 注射後 2, 12 및 24日에 各 動物을 犧牲시켜 胸腺을 떼어 細胞數를 計算하였다. 細胞數計算은 Turk Solution(1 ml glacial acetic acid, 10 mg crystal violet, 99 ml 증류수)으로 희석한 다음 hemocytometer에서 실시하였다.

細胞浮游液: Minimal Essential Medium for Suspension Culture (MEM-S, Microbiological Associates, Inc., Bethesda, Md.)에 조심스럽게 teasing 하고 Nylon mesh로 濾過하여 寒冷 MEM-S로 4°C에서 3回 遠沈 洗滌하였다.

細胞分劃(Cell fractionation): Bovine Serum Albumin (BSA, Lot 126, Miles Lab., Inc., Elkhart, Ind.)를 使用하여 前報와 같은 方法¹⁰⁾ 即, Discontinuous albumin density gradient 方法에 準하였다. 簡記하면, 胸腺細胞(7.2×10^8)를 30% BSA 5.5 ml에 조심스럽게 浮游하여 35 ml Cellulose Nitrate tube에 넣고 27%, 24%, 20% BSA 溶液 各 7 ml를, 마지막으로 10% BSA 溶液 5 ml를 重層하고(Beckman Spinco SW 25.1 rotor에 12,000 rpm (maximum force, 20,000 g at the tip of the tube)速度로 4°C에 30分間 遠沈하였다. 이렇게 해서 density interface에 形成된 discrete band(上層으로부터 A, B, C, D 및 P(pellet)라 稱)를 Pasteur pipette로 수확(harvest)하였다. 그後 MEM-S로 2回 遠沈洗滌하여 供試하였다.

細胞의 生存檢査(Viability test): Trypan blue dye exclusion test¹¹⁾로 實施하였다. 200細胞를 觀察하였다.

細胞培養과 PHA 刺戟: 培養條件은 前報¹²⁾와 같도록 하였다. 培地는 MEM-S에 penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml, L-glutamine 2 mM/ml 그리고 新鮮한 Lewis rat 血清 10% (V/V)를 添加한 것을 使用하였으며 胸腺細胞 5×10^6 을 總量 1 ml 培地에 培養하였다. Mitogen 으로서는 PHA-P (Difco Lab., De-

troit, Michigan)를 使用하였으며 培養을 始作할때 0.5 μ l/ml, 1.0 μ l/ml 및 2 μ l/ml의 濃度の PHA-P로 刺戟하였다. 培養은 37°C의 CO₂부란기에서 實施하였으며 48時間 培養後 tritiated thymidine(³H-TdR, Specific Activity 1,9 Ci/m Mol., New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) 1 μ Ci로 pulse 하고 다시 18時間 培養後 遠沈하여 前報¹⁰⁾와 같이 처리하여 Scintillation Counting 하였다. 成績은 Count per minute (CPM)로 表示하였다. 即 反應은 實驗培養의 平均 CPM(C) 對照培養의 平均 CPM(C) 또는 E/C로 表示하였다.

實驗成績

HC 處理가 胸腺細胞數에 미치는 影響: 實驗動物을 HC로 處理한 後 2日에 胸腺細胞數는 正常動物의 約 9%로 減少되었으며 HC 處理後 12日에는 71%에 이르렀다. HC 處理後 24日에는 完全 正常으로 回復되었다(表 1參照). HC 處理動物의 胸腺은 肉眼的으로도 그 크기가 顯著히 감소되어 있음을 觀察할 수 있었으며 組織學的으로는 胸腺皮質에 小림바구는 거의 觀察할 수 없었다.

Table 1. Effect of Hydrocortisone on Yield of Thymocytes*

Days after HC treatment	Average number of cell per thymus \pm S.D. ($\times 10^7$)	% of control
Untreated controls	121 \pm 17.7(7)**	100
2	10.7 \pm 2.1(6)	8.95 \pm 1.6
12	86.0 \pm 7.0(6)	71.1 \pm 3.4
24	147.5 \pm 12.3(6)	121.9 \pm 2.6

* Lewis rats treated with 25 mg of hydrocortisone acetate (HC) intraperitoneally.

** Figures in parentheses indicate the number of animals.

HC 處理가 胸腺細胞의 密度에 미치는 影響: HC 耐性胸腺細胞의 密度變化를 分劃의 分布에 따라 實驗한 結果로 第2表와 같이 A 및 B 分劃에는 細胞數가 相當히 增加하고 특히 C 分劃에도 顯著한 增加를 나타냈으나 D 및 P 分劃에는 減소를 나타냈다.

HC 處理動物에 있어서의 胸腺細胞의 死滅率: 正常動物과 HC 處理動物에 있어서 胸腺細胞의 Viability를 檢査하였던 바, 第3表와 같은 結果를 얻었다. 即 HC

Table 2. Distribution of Normal Thymocytes and Hydrocortisone Resistant Thymocytes in Various Fractions.

Cell Fraction	Average % of total yield±S.D.*	
	Noramal	HC treated**
A	1.0±0.2	2.1±0.4
B	8.3±2.4	14.4±8.2
C	22.4±6.2	48.2±11.2
D	51.1±5.8	20.4±7.8
P	17.5±12.4	14.4±9.7

* Data were average of 7 experiments.

** Hydrocortisone acetate 25 mg intraperitoneally 2 days prior to sacrifice.

Table 3. Comparison in Viability of Thymus Cells from Normal and Hydrocortisone Treated Rats.

Cell Fraction	% of dead cells±S.D.*	
	Normal	HC treated
Original	3.2±0.8	19.7±10.3
A	4.2±0.1	12.0±4.0
B	3.7±0.3	4.4±1.0
C	1.6±0.2	1.0±0.1
D	0.4±0.2	2.5±0.5
P	5.5±1.4	43.6±16.8

* Data were average of 7 experiments. Viability was determined by the dye exclusion test, and was recorded as per cent of dead cells on the basis of 200 cells counted.

로處理한 動物의 胸腺細胞死滅率(19.7%)이 正常動物의 그것(3.2%)보다 高率이었다. 正常胸腺細胞와 HC處理胸腺細胞를 分劃하였던 바 第3表와 같이 HC處理胸腺細胞의 死滅細胞는 A, B 및 P分劃에 集積되었으나 C分劃에 있어서는 多少 감소되었다.

胸腺細胞의 PHA에 대한 反應: HC에 比較的 耐性을 나타내는 胸腺細胞가 HC에 感受性인 胸腺細胞보다 Graft-vs-Host 反應과 溶血素反應에 있어서 B淋巴球를 協調한다는 Anderssen等¹³⁾, Blomgren等⁶⁾ 및 Cohn等⁷⁾의 報告를 參照하고, 또한 前報^{10, 14, 15)}의 實驗結果 免疫反應을 特異적으로 抑制하는 胸腺抑制細胞(thymic Suppressor cell)가 있고 이들은 주로 HC 耐性淋巴球이며 比較的 密度가 낮은 C band에 있음을 알았으므로 이번엔 HC處理로 PHA에 反應하는 細胞를 enrichment

Table 4. Response of Normal and Hydrocortisone Treated Thymocytes to PHA*

Cell Fraction	Normal control cells		HC resistant cells	
	E-C	E/C	E-C	E/C
Original	1714±124	4.2±1.9	3470±324	10.2±2.1
A B	14,776±1123	7.7±2.4	12,851±1321	7.5±0.1
C	123±8	2.1±0.3	527±15	5.3±0.6
D	25±2	1.2±0.2	592±54	4.2±0.3

* Data were obtained from 7 experiments.

E-C: Thymidine incorporation (CPM) in culture with PHA minus incorporation in normal control cultures.

E/C: Ratio of CPM in culture with PHA over CPM in normal control.

할 수 있는 可能性과 그들의 密度에 따른 PHA에 對한 反應態度를 알아보고자 HC 耐性細胞를 密度에 따라 分劃하고 PHA에 對한 反應을 實驗하였다. 그 結果 第4表와 같이 PHA에 對한 HC處理動物의 胸腺細胞의 反應(E-C, 3470; E/C, 10.2)은 正常動物의 그것(E-C, 1714; E/C, 4.2)보다 約2倍 增加하였다. Subpopulation 中에서는, 正常動物에서 大體의으로 反應치 않은 D分劃細胞는 PHA에 對한 反應이 顯著히 增加(E/C 1.2에서 4.2로) 하였으며 C分劃細胞도 相當히 增加(E/C 2.1에서 5.3으로)하였다. 그러나 A와 B分劃細胞는 그 反應이 多少 抑制되었다.

考 按

Corticosteroid가 淋巴球組織 特히 胸腺의 皮質에 있는 未熟細胞를 파괴하여 體液性 및 細胞性免疫反應을 抑制^{9, 16)}한다는 것은 잘 알려져 있지만 그 機轉은 아직 不明하다. Esteben⁹⁾은 Short-lived lymphocyte는 long-lived lymphocyte보다 HC에 더 感受性이 있음을 報告하였으며 Cohn等^{6, 7)}은 分裂하고 있는 모든 淋巴樣細胞가 HC에 感受性인 것이 아니며 proliferative phase에 있는 T細胞도 HC에 耐性인 것이 있으며 이 HC 耐性細胞는 溶血素反應 및 Graft-vs-Host 反應을 일으킨다고 報告하였다. 著者의 本 實驗結果, HC處理動物의 胸腺細胞는 正常動物의 胸腺細胞數의 8.9%이었으며 이는 前報¹⁰⁾ 및 Blomgren⁶⁾의 成績과 類似하였으며 D 및 P分劃에 있는 非分裂細胞가 HC에 感受性이었는데 이와 같은 成績은 興味있었다. 또한 本 實驗 結果, HC處理後 12日에는 動物의 胸腺細胞의 數는

거의 정상동물의 세포數와 비슷(71.1%)하였고, HC 處理後 24日에는 完全 正常으로 回復되었는데(第1表 參照) 이와 같은 結果는 HC 耐性細胞 또는 HC에 파괴되지 않고 남은 HC 感受性細胞의 一部가 繁殖해서 HC 處理後 12日 및 24日에 回復된 것으로 思料되었으며 胸腺細胞의 Generation time이 9時間 30分이라는 Michalke 等¹⁷⁾의 報告를 勘案하던 이를 首肯할 수 있을 것 같았다.

HC로 處理된 動物의 胸腺細胞가 PHA에 對해서 反應이 增加되었다는 本 實驗結果는 HC가 免疫反應에 關係가 없는 胸腺細胞를 파괴해서 免疫學的 能力細胞를 enrichment한 結果로 思料되었으며, 또한 이와 같은 結果는 HC 處理로 成熟한 T細胞를 選擇의으로 分離(Separation)할 수 있음을 暗示하며, 著者等¹⁰⁾은 HC 處理로 體液性 및 細胞性 免疫을 抑制하는 胸腺細胞를 選擇한 바 있다. HC로 動物을 處理하면 胸腺細胞는 D 및 P分劃에 그 數가 감소되고, A 및 B分劃 特別 C分劃에 細胞數가 集積되며 細胞의 再分布가 있음(第2表 參照)과 PHA에 對해서도 各分劃에 따라 그 反應이 增加 또는 減少(第4表)됨을 알 수 있었는데 이는 胸腺細胞의 異質性(heterogeneity)을 暗示한 結果라고 생각하였으며 또한 胸腺의 細胞分化의 複雜性¹⁸⁾을 나타내는 結果라고 생각되었다. 胸腺細胞의 異質性에 關하여서는 Raff¹⁹⁾, Tigelaar 等²⁰⁾, Moorhead 等¹⁶⁾, 및 Shih-Wu 等¹³⁾도 最近 報告하고 있다. 또 한편으로는 本 實驗結果, HC에 依해서 胸腺細胞의 密度가 變化되고, HC에 依해서 胸腺細胞의 PHA에 對한 反應이 增加된 것은, 胸腺細胞의 HC에 對한 感受性은 HC-receptor 數와 關係가 있다는 Baxter 等²¹⁾의 報告를 考慮하면, HC가 lysosome 膜을 安定시키듯이 HC가 胸腺細胞에 直接 作用하여 細胞의 表面成分을 變化시켜서 생기는 結果가 아닌가 생각되었다¹⁶⁾.

要 約

實驗動物(Lewis rat)을 hydrocortisone acetate(HC)로 處理한 2日後의 處理動物의 胸腺細胞數는 正常動物의 8.9%로 감소하였으며, HC 處理後 12日에는 正常動物의 71.1%이었다. HC 處理後 24日에는 HC 處理動物의 胸腺細胞數는 正常動物의 그것과 같았다.

Bovine Serum Albumin을 使用한 密度勾配遠沈法에 依하여 胸腺細胞를 分劃하였던 바, HC 處理動物에 있어서는 正常動物에 比하여 比較의 密度가 높은 D分劃細胞는 감소되었으나 比較의 密度가 낮은 A+B 및 C

分劃細胞는 相當히 增加하였다.

HC 處理動物의 胸腺細胞는 死細胞가 正常動物의 그것보다 많았으며 死細胞는 pellet 와 A分劃에 集積되었다.

HC 處理動物의 胸腺細胞는 正常動物의 그것에 比해서 phytohemagglutinin에 對한 反應이 增加하였으며 特別 D分劃細胞의 그것에 對한 反應은 顯著히 增加하였다. C分劃細胞의 PHA에 對한 反應도 多少 增加하였다.

REFERENCES

- 1) Jutila, J.W.: Wasting disease induced with cortisol acetate III. Immunological studies, *J. Immunol.*, 102:963, 1969.
- 2) Vischer, T.L.: Effect of hydrocortisone on the reactivity of thymus and spleen cells of mice to in vitro stimulation, *Immunology*, 23:777, 1972.
- 3) Esteban, J.N.: The differential effect of hydrocortisone on the short-live small lymphocyte, *Anatomical Record*, 162:349, 1963.
- 4) Warner, N.L.: The immunological role of different lymphoid organs in the chicken, III. The immunologic competence of thymic cell suspensions, *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 42:401, 1964.
- 5) Blomgren, H. And Andersson, B.: Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus, *Exp. Cell Research*, 185, 1969.
- 6) Cohen, J.J., Fischbach, M. and Claman, H.N.: Hydrocortisone resistance of graft-vs-host activity in mouse thymus, spleen and bone marrow, *J. Immunol.*, 105:1146, 1970.
- 7) Cohen, J.J. and Claman, H.N.: Thymus-marrow immunocompetence II. Hydrocortisone-resistant cells and process in the hemolytic antibody response of mice, *J. Exp. Med.*, 133:1026, 1971.
- 8) Blomgren, H.: Synergism between thymocytes and lymph node cells in the graft-versus-host response, *J. Immunol.*, *J. Immunol.*, 110:144, 1973.
- 9) Blomgren, H. and Svedmyr, E.: In vitro stimulation of mouse thymus cells by PHA and allogenic cells, *Cell. Immunol.*, 2:235, 1971.



- 10) Ha, T.Y., Waksman, B.H., and Treffers, H.P.: *The thymic suppressor cell I. Separation of subpopulations with suppressor activity*, *J. Exp. Med.*, 139:13, 1974.
- 11) Boyse, E.A., Old, L.J., and Thmas, G.: *A report on some observations with a simplified cytotoxic test*, *Trans. Bull.*, 29:63, 1962.
- 12) 河大有: 混合培養에 있어서 脾臟細胞와 胸腺細胞의 相互作用. 全南醫大雜誌, 10:681, 1973.
- 13) Andersson, B. and Blomgren, H.: *Evidence for a small pool of immunocompetent cells in the mouse thymus*, *Cell. Immunol.*, 1:362, 1970.
- 14) Ha, T.Y. and Waksman, B.H.: *Role of the thymus in tolerance X. "suppressor" activity of antigen-stimulated rat thymocytes transferred to normal recipients*, *J. Immunol.*, 110:1290, 1973.
- 15) 河大有: 抗體形成과 GVH反應에 있어서의 胸腺細胞抑制作用. 全南醫大雜誌, 10:689, 1973.
- 16) Moorhead, J.W. and Claman, H.N.: *Thymus derived lymphocytes and hydrocortisone*, *Cell. Immunol.*, 5:74, 1972.
- 17) Michalke, W.D., Hess, M.W., Riedwyl, H., Stoner R.D., and Cottier, H.: *Thymic lymphopiasis and cell loss in newborn mice*, *Blood*, 33:541, 1969.
- 18) Shih-Wu, A.Y. and Waksman, B.H.: *Cellular differentiation in the thymus IV*, *Cell. Immunol.*, 3:516, 1972.
- 19) Raff, M.C.: *Evidence for subpopulation of mature lymphocytes within mouse thymus*, *Nature New Biology*, 229:182, 1971.
- 20) Tigelaar, R.E. and Asofsky, R.: *Graft-vs-host activity of mouse thymocytes. Effect of cortisone pretreatment of donors*, *J. Immunol.*, 110:567, 1973.
- 21) Baxter, J.D., Harris, A.W., Tomkins, G.M. and Chon, M.: *Glucocorticoid receptors in lymphoma cells in cultur: Relationship to glucocorticoid killing activity*, *Science*, 171:189, 1971.