

Methamphetamine이 B16 악성 흑색종 세포 전이에 미치는 영향

신전수 · 박현애 · 정승태 · 김필선 · 손경희 · 선우연 · 한형미*
국립보건안전연구원 독성부

The Effect of Methamphetamine on the Pulmonary Metastasis of B16 Melanoma Cells

Jeon Soo SHIN, Hyeon Ae PARK, Seung Tae CHUNG, Pil Sun KIM,
Kyung Hee SOHN, Yearn SUNWOO and Hyung-Mee HAN*

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-020, Korea

(Received November 3, 1995; accepted December 9, 1995)

Abstract—The effect of methamphetamine on the pulmonary metastasis was investigated in C57BL/6 mice injected with B16 melanoma cells. B16 melanoma cells (2×10^5 cells) were injected intravenously into 5~7 weeks old C57BL/6 mice. Mice were then treated intraperitoneally with methamphetamine either acutely (two times with one week interval) or subchronically (daily for 14 days). Degree of pulmonary metastasis was investigated and specific immunologic parameters such as natural killer cell cytotoxicity(NKCC), antibody-dependent cellular cytotoxicity(ADCC) and blastogenic responses of splenocytes were examined. Mice which had been subchronically treated with methamphetamine showed significant decreases in the number of pulmonary metastasis of B16 melanoma cells, NKCC and ADCC without a significant change in blastogenic responses. In the acutely-treated group, slight trends of decrease in the numbers of pulmonary metastasis, NKCC and ADCC were observed without statistical significances whereas there was a significant increase in blastogenic responses. The mechanism underlying the decrease in the degree of metastasis despite diminished NKCC and ADCC after methamphetamine treatment and the relationship between the degree of pulmonary metastasis and duration of methamphetamine treatment remain to be investigated.

Keywords □ methamphetamine, metastasis, natural killer cell, blastogenesis, ADCC

스트레스에 지속적인 노출은 면역기능을 저하시켜 궁극적으로 암을 포함한 여러 질병에 잘 걸리게 된다(Ader, 1980; Borysenko와 Borysenko, 1982; Sklar와 Anisman, 1981; Solomon과 Amkraut, 1981). 그 예로 스트레스는 항체의 형성을 감소시키고(Solomon, 1969), 피부이식시 거부 반응을 늦추며(Wistar와 Hildemann, 1960), 분열 원질(Keller 등, 1981; Laudeslager 등, 1982; Monjan와 Collector, 1977)과 항원(Joasoo와 Mckenzie, 1976) 자극에 대한 림프구의 반응을 억제시킨다. 스트레스는 또한 opioid peptide를 분비시키며 이 opioid는 면역조절에 영향을 미친다. 실제로 시험관에서 morphine과 opioid

peptide는 T 림프구의 rosette 형성(Wybran 등, 1979)과 분열원질에 대한 반응을 변화시키며(Gilman 등, 1982), opiate에 중독 되면 말초혈액 림프구의 분열원질에 대한 반응변화(Rice 등, 1979)와 tumor necrosis factor 분비저하 등(Chao 등, 1993) 면역반응의 변화를 일으킨다.

저자들은 스트레스자극에 대한 행동반응을 증가시키는 methamphetamine의 투여가 면역기능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 methamphetamine을 마우스 복강내 투여한 결과 항체형성능의 변화는 대조군과 큰 차이가 없으나 체중 및 흉선의 무게가 감소하여 methamphetamine의 투여가 세포성 면역에 변화를 일으킬 가능성이 있음을 관찰한 바 있다(Yoon 등, 1994). 본 실험에서는 마우스에 B16 악성 흑색종 세포를 정맥주사하고 metha-

* To whom correspondence should be addressed.

amphetamine을 투여한 후 폐전이 중앙 세포수를 관찰하고 tumor surveillance에 중요한 작용을 하는 자연살세포 독성능 (natural killer cell cytotoxicity, NKCC, Herberman과 Ortaldo, 1981)과 항체의존성 세포독성능 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 그리고 분열원질에 대한 비장세포 증식능을 측정하여 methamphetamine이 암 전이 및 면역기능에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

실험방법

마우스 및 암세포 전이능 측정

용성 5~7 주령의 C57BL/6 마우스를 3군으로 나누어 먼저 꼬리정맥으로 C57BL/6 마우스 유래의 B16 악성 흑색종 세포를 주입하였다. 악성흑색종은 L-glutamine (2 mM), penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml) 및 HEPES buffer (10 mM)가 함유된 RPMI 1640 배지 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)에 우태아혈청 (Gibco)이 10% 함유된 배지 (이하 완전배지)에 세포를 배양하고 생리식염수로 3회 세척한 후 마리당 세포부유액 0.2 ml (1×10^6 세포수/ml)을 꼬리정맥에 주사하여 폐종양을 유발시켰다.

Methamphetamine의 투여는 악성 흑색종 세포를 주입한 1~2시간 후에 실시하였다. 급성투여군 (acutely-treated group)은 methamphetamine 5 mg/kg을 1주일 간격으로 두 번 복강내 투여하고 나머지 날짜는 생리식염수를 투여하였으며, 만성투여군 (subchronically-treated group)은 매일 methamphetamine을 14일간 반복투여하였고 대조군 (control group)은 생리식염수를 투여하였다. 마지막 투여 24시간 후에 마우스를 희생시켜 양쪽 폐의 pleural surface에 전이된 폐종양 colony수를 세어 통계 처리 하였다.

Methamphetamine의 B16 악성흑색종에 대한 세포독성능 측정

Methamphetamine이 B16 악성흑색종 세포에 직접으로 세포독성이 있는지 여부를 MTT (methylthiazol tetrazolium bromide, Sigma) 검정법을 이용하였다 (Mosmann, 1983). 먼저 B16 악성 흑색종 세포를 RPMI 1640으로 3회 세척한 후 완전배지에 5×10^5 세포수/ml 농도로 조절하고 actinomycin D (Sigma)를 최종농도 1 µg/ml이 되도록 첨가하여 96 well microplate에 100 µl씩 분주하고 methamphetamine을 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000 µg/ml이 되도록 각 well에 100 µl씩 넣은 후 24시간 배양하였다. 그 후 MTT를 최종농도 1 mg/ml이 되게 첨가하고 4시간 더 배양한 후 MTT 용액을 버리고 50 µl의 dimethylsulfoxide (Merck, Darmstadt, Germany)를 넣고 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 triplicate로 세포독성 여부를 관찰하였다.

비장림프구의 자연살 세포 독성능 측정 (NKCC)

각 실험군의 마우스는 최종 약물투여한 24시간 후에 희생하여 먼저 양쪽 폐를 떼어낸 후 폐에 형성된 악성 흑색종 수를 세어 methamphetamine 투여가 중앙에 미치는 영향을 관찰하였다. 그리고 비장세포의 기능변화를 관찰하기 위하여 비장을 적출하여 단세포 부유액으로 만든 후 증류수를 이용한 hypotonic shock 방법으로 적혈구를 제거하고 RPMI 1640배지로 3회 세척하여 완전 배지에 부유시키고 배양하였고 표적세포는 마우스 NK 세포 작용에 감수성이 있는 Yac-1 세포를 사용하였다. Yac-1 세포 (1×10^6 세포수/0.2 ml)에 100 µCi의 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (1 mCi/ml, NEZ-030S, New England Nuclear, Boston, Ma., USA)을 가하여 37°C 항온수조에서 1시간동안 표지화 (labelling)시켰다. 그 후 완전 배지로 3회 세척하고 1×10^5 세포수/ml이 되도록 완전배지에 부유시킨 후 96 well microplate (Corning, NY, USA)에 well 당 1×10^4 세포가 되도록 분주하고 주효세포 (비장림프구): 표적세포의 비율이 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1이 되도록 주효세포를 0.1 ml 가한 후 150 xg에 2분 원심분리하여 가라앉힌 후 37°C, 5% 항온항습기에서 4시간 반응시켰다. 최대방출 (maximum release)은 대조 well에 2% SDS를 100 µl 가하였고 자연방출 (spontaneous release)은 포지티브된 세포를 같은 용량의 완전배지에 배양하여 이용하였다. 각 실험은 triplicate로 하였으며 사용 후 microplate를 200 xg에 10분간 원심한 후 상층액 50 µl를 취하여 gamma counter (Packard, IL, USA)로 방사능을 측정하였으며 세포독성능은 다음 공식에 의하여 계산하였다. % cytotoxicity = [(test release - spontaneous release) / (maximum release - spontaneous release)] × 100

항체의존 세포독성 측정 (ADCC)

표적세포인 L1210 세포를 위와 동일한 방법으로 표지화 (labelling)시켜 사용하였으며 항 L1210세포 항체로는 NZW 토끼에 면역시켜 얻은 토끼 혈청을 56°C에서 30분 동안 비동화 시킨 후 1 : 1000으로 희석하여 사용하였다. ADCC 측정은 위와 같은 방법으로 4시간 ^{51}Cr 방출법을 사용하였다. 먼저 표적세포를 well당 1×10^4 세포수/0.1 ml이 되도록 넣은 후 항체 50 µl, 주효세포 50 µl를 넣어 반응시켰으며, 주효세포 : 표적세포의 비율은 25 : 1, 50 : 1, 100 : 1이 되도록 조정하였다.

비장세포 증식능 측정

마우스에서 얻은 비장세포를 완전배지에 1×10^6 세포수/ml이 되도록 조정한 후 96 well microplate의 각 well에 200 µl씩 분주하고 분열원질로 phytohemagglutinin (PHA, Sigma)과 lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 055 : B5, Sigma)를 10 µg/ml이 되도록 첨가하고 3일간 배양하였다. 그 후 ^3H -thymidine (6.7 Ci/mM, NEN, Boston, MA)을 well당 1 µCi씩 첨가한 후 18시간 더 배양한 후 glassfiber 용지에 수확한 후 cocktail 용액에 넣어 방사능량을 β-counter에 측정하였다. 각 실험은 triplicate로 하였으며 증식정도는 자극지수로 표현하였다. 자극지수

(stimulation index)=the stimulated cell cpm/the unstimulated control cell cpm

통계처리

본 실험의 결과는 mean±SE(standard error)로 나타내었고 비모수 검정법인 Mann-Whitney U test 방법을 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과

Methamphetamine의 B16 악성흑색종 세포독성에 미치는 영향

B16 악성흑색종 세포를 마우스 꼬리정맥에 주입한 후 methamphetamine을 투여하고 methamphetamine 자체가 B16 세포에 독성능이 있는지의 여부를 *in vitro*에서 관찰한 결과 methamphetamine 농도 300 µg/ml까지는 세포독성능이 없었으나 약 400 µg/ml부터 B16 세포 독성능이 관찰되었다(Fig. 1). 따라서 본 실험에서 마우스에 투여한 methamphetamine의 양 (5 mg/kg)은 마우스 체중을 20~30 g으로 생각할 때 약 100~150 µg에 해당하며 이 양은 B16 악성흑색종의 세포독성에 영향이 없음을 관찰할 수 있었다.

Methamphetamine 투여가 악성흑색종의 폐전이 형성에 미치는 영향

마우스에 B16 악성 흑색종 세포를 2×10^5 세포를 정맥주사한 후 생리식염수 혹은 methamphetamine을 마지막으로 투여한 24시간 후에 희생시켜 폐전이 결절수를 관찰한 결과 1주일 간격으로 두번 투여한 급성군의 결절수(49.0 ± 9.0)은 대조군의 결절수(56.1 ± 10.0)보다 낮았으나 통계적인 의미는 없었으며 14일간 매일 반복투여한 만성군의 결절수(34.9 ± 3.4)은 대조군에 비하여 통계적

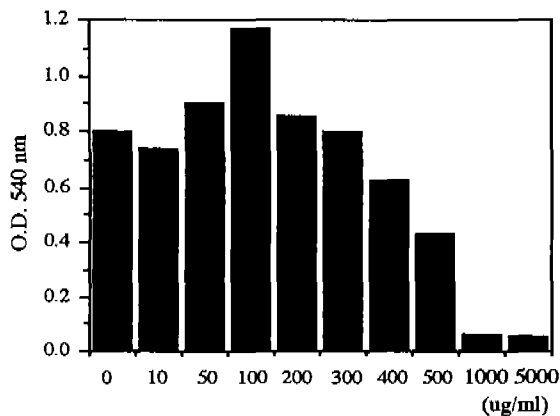


Fig. 1. Cytotoxic activity of methamphetamine to B16 melanoma cells *in vitro* by using the MTT method. B16 melanoma cells (5×10^4 cells/well) were cultured with methamphetamine for 24 hours on the 96 well microplate. MTT dye was added to the each well with final concentration of 1 mg/ml, and cultured another 4 hours. The optical density was analysed at 540 nm.

으로 의미 있게 ($p < 0.05$) 형성된 결절수가 적었다(Fig. 2). Methamphetamine 투여가 자연살 세포 독성능 및 항체 의존성세포 독성능에 미치는 영향

Methamphetamine을 투여한 후 마우스 자연살 세포 독성능의 변화를 측정된 결과 주효세포 : 표적세포의 비율을 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1일 때 대조군은 각각 $9.38 \pm 2.49\%$, $9.44 \pm 0.53\%$, $9.85 \pm 0.57\%$ 이었고, 급성투여군은 $6.60 \pm 0.62\%$, $9.20 \pm 1.19\%$, $9.25 \pm 1.14\%$ 로서 각 비율에서 두 군간에 통계적인 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 만성투여군은 $4.77 \pm 0.58\%$, $7.02 \pm 0.82\%$, $7.14 \pm 1.00\%$ 로서 대조군과 비교할 때 각 비율 모두 $p < 0.05$ 로 통계적인 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

또한 표적세포 L1210을 이용하여 ADCC를 측정할

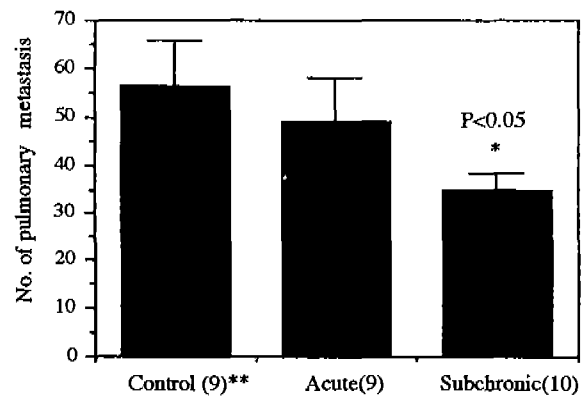


Fig. 2. Number of pulmonary metastasis induced by B16 melanoma cells in C57BL/6 mice treated with methamphetamine. The mice were intravenously injected with B16 cells (2×10^5 cells), and methamphetamine was intraperitoneally injected according to the treatment schedule. The metastatic pulmonary nodules were counted on the pleural surface of both lungs. * $p < 0.05$, **number of mice.

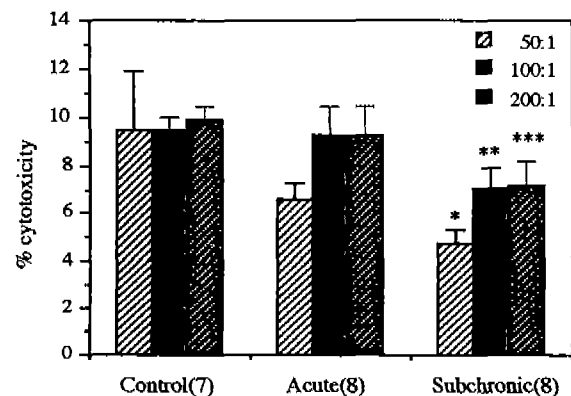


Fig. 3. Natural killer cell activities of splenocytes of C57BL/6 mice which were acutely or subchronically treated with methamphetamine. The splenocytes were assessed 24 hours after last intraperitoneal injection, and the activity was observed by 4 hour-chromium-releasing assay. The effector cell to target cell (Yac-1 cell) ratio is 50, 100 or 200 to 1. * $p = 0.015$; **, *** $p = 0.049$.

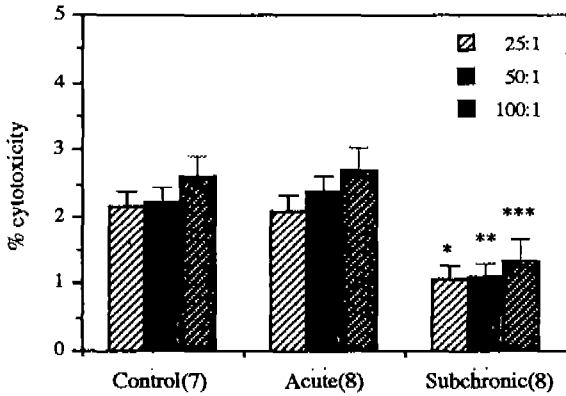


Fig. 4. Antibody-dependent cellular cytotoxic activities of splenocytes of C57BL/6 mice which were acutely or subchronically treated with methamphetamine. The splenocytes were assessed and the activity was observed by 4 hour-chromium-releasing assay. The effector cell to target cell(L1210 cells) ratio is 25, 50 or 100 to 1. *,**p=0.008, ***p=0.020.

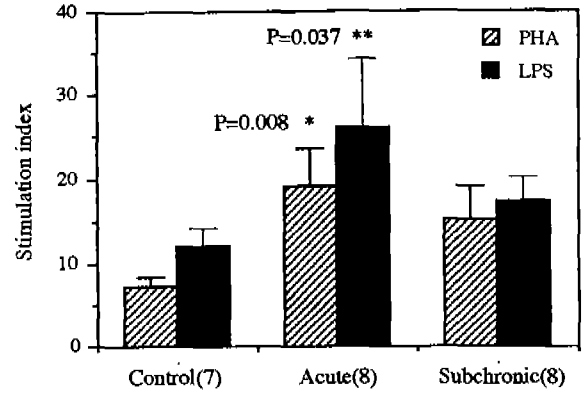


Fig. 5. The blastogenic response of splenocyte of C57BL/6 mice which were acutely or subchronically treated with methamphetamine. The splenocytes (2×10^5 cells/well) were stimulated with PHA or LPS for 72 hours, and pulsed with tritiated-thymidine for 18 hours. The activity was counted, and the stimulation index was assessed. *p=0.008, **p=0.037.

결과 주효세포 : 표적세포의 비율을 25 : 1, 50 : 1, 100 : 1 일 때 대조군은 각각 $2.15 \pm 0.22\%$, $2.21 \pm 0.23\%$, $2.61 \pm 0.29\%$ 이었고, 급성투여군은 $2.10 \pm 0.22\%$, $2.40 \pm 0.21\%$, $2.72 \pm 0.32\%$ 로서 두 군간에 각 비율에서 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 만성투여군은 $1.07 \pm 0.20\%$, $1.11 \pm 0.19\%$, $1.34 \pm 0.33\%$ 로서 대조군과 비교할 때 25 : 1과 50 : 1의 비율은 $p < 0.01$, 100 : 1은 $p < 0.05$ 의 통계적인 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

Methamphetamine투여가 비장세포 증식능에 미치는 영향

Methamphetamine을 투여 후 비장세포를 얻어 PHA 혹은 LPS로 자극하여 증식능의 변화를 자극지수로 관찰한 결과 PHA 자극시 대조군, 급성투여군, 만성투여군은 각각 7.2 ± 1.2 , 19.1 ± 4.3 , 15.1 ± 3.9 로서 methamphetamine 투여시 세포 증식능이 증가하는 경향을 보였고 특히 급성투여군의 증식능은 통계적으로 유의한 ($p < 0.01$) 결과를 나타내었다. LPS의 자극시 각 군의 자극지수는 12.0 ± 2.2 , 26.2 ± 8.1 , 17.2 ± 3.0 로서 PHA의 자극과 마찬가지로의 결과를 보여 methamphetamine 투여시 세포 증식능이 증가하는 경향을 보였고 특히 급성투여시 통계적으로 유의한 ($p < 0.05$) 결과를 나타내었다 (Fig. 5).

고 찰

C57BL/6 마우스에 B16 악성흑색종 세포를 정맥내 주사한 후 methamphetamine을 투여한 결과 대조군보다 급성투여군과 만성투여군 모두 폐전이 암발생 숫자가 감소하는 경향을 보였으며 특히 만성투여군(14일간 투여)에서는 통계적으로 의미 있는 ($p < 0.05$) 결과를 나타내었다. 이 결과는 metastatic colon cancer를 유발한 rat에

morphine(20 mg/kg)을 3일간 피하에 반복 주사한 군이 대조군보다 종양형성수와 종양 평균 무게가 유의 있게 감소하는 결과와 유사하다(Yeager와 Colacchio, 1991). 이와 같이 methamphetamine투여시 폐전이 암발생 숫자의 감소 원인을 추정해 보면 첫째, 복강내 methamphetamine의 투여가 직접적으로 암세포를 제거하여 암발생을 줄였을 가능성이 있으며 둘째, 중추신경 흥분제인 methamphetamine이 마우스의 말초혈관의 순환등 미소 환경을 변화시켜 혈액내 (circulating) 존재하는 암세포를 제거했을 가능성이 있으며 셋째, methamphetamine 투여로 숙주의 면역기능을 항진시켜 여러 주효세포들을 활성화시켜 암발생을 억제하였을 가능성이 있으며, 넷째, methamphetamine과 암세포 표면에 존재하는 수용체와 반응으로 종양 형성에 영향을 주었을 가능성이 있으며 (Yeager와 Colacchio, 1991) 마지막으로, methamphetamine이 B16 melanoma 세포 혹은 혈관내피세포의 부착인자에 영향을 주어 암세포 전이능이 감소하였을 가능성이 있다.

우선 methamphetamine의 세포 직접 독성효과가 있는지를 관찰하여 본 결과 methamphetamine 시험관에서 $400 \mu\text{g/ml}$ 이상에서 세포독작용이 관찰되나 그 이하에서는 영향이 없었으며, 본 실험에서 마우스에 1회 투여시 사용한 양($100 \sim 150 \mu\text{g/mouse}$)은 직접적으로 세포독작용을 일으키는 범위가 아니므로 만성투여군에서 암발생의 감소가 methamphetamine 투여에 따른 세포독작용이 아님을 알 수 있었다. 둘째로 tumor surveillance에 중요한 작용을 하는 NKCC(Herbman과 Ortaldo, 1981)와 ADCC의 변화를 관찰한 결과 만성투여군의 NKCC와 ADCC가 대조군보다 의미 있게 감소함을 관찰할 수 있었다. Methamphetamine 5 mg/kg을 14일간 투여한 만

성투여군에서 NKCC 및 ADCC 활성화 감소의 정확한 기전은 알 수 없으나 morphine을 고농도(30 혹은 50 mg/kg)로 마우스에 3~4일간 투여시 NKCC가 감소하는 결과와 일치하였다(Shavit 등, 1984). Morphine이 NKCC를 감소시키는 이유는 정확히 알 수 없으나 우선 morphine이 직접적으로 면역기능을 변화시켜 나타나거나 혹은 pituitary-adrenal axis를 변화시켜 나타날 수 있다(Munson, 1973). 또한 morphine은 interferon분비를 감소시킴으로써 NK의 활성을 감소시키고, 아울러 약물과 stress 등으로 분비되는 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)이 면역기능을 감소시킴으로(Cos 등, 1982; Hochman과 Cudkowitz, 1979) NKCC의 기능이 감소되리라 생각된다. 본 실험에서 methamphetamine을 투여한 만성투여군의 암세포 전이능의 발생감소와 NKCC 및 ADCC 감소 사이에 어떤 의미가 있는지 알기에는 어려움이 있다. Freire-Gavabal 등(1992)은 mammary tumor virus에 감염된 마우스에 amphetamine을 장기간(800 days) 피하로 투여한 군이 식염수만 주사한 대조군보다 종양형성수가 많게 나타나(Freire-Garabal 등, 1992) 본 실험과 상반된 결과를 나타내었다. 이 결과는 아마도 amphetamine투여기간의 차이에 따른 것으로 생각되며 따라서 amphetamine 투여기간과 암발생 사이에 어떤 관계가 있는지 좀 더 관찰해 보아야 할 것으로 생각된다.

또한 암 전이는 cytokine의 영향을 받게 되는데 특히 interleukin(IL)-1(Giavazzi 등, 1990)과 tumor necrosis factor(TNF)- α (Brosz 등, 1993)를 종양세포주입 24 시간 이내에 주입시 현저히 증가한다. 이는 cytokine이 암세포와 혈관내피 세포의 부착과 관계 있는 부착인자(adhesion molecule) 발현에 중요함을 나타낸다. 본 실험에서 methamphetamine이 IL-1 혹은 TNF의 형성을 감소시키거나 혹은 다른 방법으로 부착인자의 발현에 영향을 주어 암세포 전이를 감소시켰을 가능성이 있으므로, 앞으로 methamphetamine이 cytokine 생성과 부착인자의 발현에 미치는 영향을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

Methamphetamine이 마우스 비장세포 증식반응에 미치는 영향을 관찰한 결과 PHA 혹은 LPS로 자극시 급성투여군, 만성투여군 모두 자극지수가 증가하는 경향을 보여 T세포, B세포 모두 공통된 효과를 나타내었고 특히 급성투여군의 자극지수가 대조군보다 의미 있게(PHA, $p < 0.01$; LPS, $p < 0.05$) 증가하였으나 그 기전은 확실치 않다. Morphine은 swine에서 DNFB(dinitrofluorobenzene)에 대한 지연형 과민 피부반응의 감소를 나타내고(Moltor 등, 1992), amphetamine를 투여한 마우스의 비장세포 증식반응은 감소를 나타내었다(Freire-Garabal 등, 1991). 그러나 Shen 등(1994)은 cocaine에 노출된 마우스의 비장세포 증식능은 대조군과 차이를 나타내지 않으며 비장세포 증식능이 면역상태의 판단기준으로 적합하지 않다고 하여 비장세포 증식능의 결과를 면역증강여부의 효과로 관찰하는 것에 대한 의문을 제기하였다. 본

실험에서 methamphetamine의 투여에 따른 비장세포의 증식능은 급성투여군에서 증가하였으며 이 결과는 본 저자들이 관찰한 급성투여군에서 비장세포수 및 비장무게의 증가(Yoon 등, 1994)와 관계가 있으리라 생각된다. 아울러 마우스에 투여한 methamphetamine의 양이 높지 않고 methamphetamine 투여로 일시적인 증식억제 후에 rebound로 증식능이 증가되었을 가능성(Beilin 등, 1989)을 또한 배제할 수 없다.

본 실험에서 14일간 methamphetamine의 반복투여에 의한 B16 악성흑색종의 폐전이수의 감소가 NKCC 및 ADCC의 감소에는 불구하고 나타난 이유는 자세히 알기 어려웠으나 이와 같은 종양형성의 변화가 methamphetamine에 의한 미소 혈류 환경의 변화의 의존한 것인지 혹은 opiate 수용체와의 반응에 의한 영향인지 혹은 세포분착인자와 다른 활동도의 변화 같은 영향인자가 있는지의 여부는 좀 더 연구되어야 할 것이다.

참고문헌

- Ader, R. (1980). Psychosomatic and psychoimmunologic research. *Psychosom. Med.* **42**, 307-321.
- Beilin, B., Martin, F. C., Shavit, Y., Gale, R. P. and Liebeskind, J. C. (1989). Suppression of natural killer cell activity by high-dose narcotic anesthesia in rats. *Brain. Behav. Immunol.* **3**, 129-137.
- Borysenko, M. and Borysenko, J. (1982). Stress, behavior and immunity: animal models and mediating mechanisms. *Gen. Hosp. Psychiat.* **4**, 59-67.
- Chao, C. C., Molitor, T. W., Close, K., Hu, S. and Peterson, P. K. (1993). Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Int. J. Immunopharmac.* **15**, 447-453.
- Cox, W. I., Holbrook, N. J., Grasso, R. J., Spector, S. and Friedman, H. (1982). Suppression of the natural killer cell activity of murine spleen cell cultures by dexamethasone(41 489). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **171**, 146-150.
- Freire-Garabal, M., Balboa, J. L., Nunez, M. J., Castano, M. T., Llovo, J. B., Fernandez-Rial, J. C. and Belmonte, A. (1991). Effects of amphetamine on T cell immune response in mice. *Life sciences* **49**, PL107-112.
- Freire-Garabal, M., Nunez, M. J., Balboa, J. L., Suarez, J. A., Gallego, A. and Belmonte, A. (1992). Effects of amphetamine on the development of MTV-induced mammary tumors in female mice. *Life Sciences* **51**, PL37-40.
- Giavizzi, R., Garofalo, A., Bani, M. R., Abbate, M., Ghezzi, P., Boraschi, D., Mantovani, A., Dejana, E. (1990). Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastasis from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res.* **50**, 4771-4775.
- Gilman, S. C., Schwartz, J. M., Milner, R. J., Bloom, F. E. and Felman, J. D. (1982). β -Endorphine enhances lymphocyte proliferation responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 4226-4230.
- Herbman, R. B. and Ortaldo, J. R. (1981). Natural killer cells:

- their role in defense against disease. *Science* **214**, 24-30.
- Hochman, P. S. and Cudkowitz, G. (1979). Suppression of natural cytotoxicity by spleen cells of hydrocortisone-treated mice. *J. Immunol.* **123**, 968-976.
- Joasoo, A. and McKenzie, J. M. (1976). Stress and the immune response in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **50**, 659-663.
- Keller, C. R., Weiss, J. M., Schleifer, S. J., Miller, N. E. and Stein, M. (1981). Suppression of immunity by stress: effect of a grade series stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science* **213**, 1397-1400.
- Laudenslager, M. L., Reite, M. R. and Harbeck, R. J. (1982). Suppressed immune response in infant monkeys associated with maternal separation. *Behav. Neural. Biol.* **136**, 40-48.
- Moltor, T. W., Morila, A., Risdahl, J. M., Murtaugh, M. P., Chao, C. C. and Peterson, P. K. (1992). Chronic morphine administration impairs cell-mediated immune responses in swine. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **260**, 581-586.
- Monjan, A. A. and Collector, M. I. (1977). Stress-induced modulation of the immune response. *Science*. **196**, 307-308.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55.
- Munson, P. L. (1973). Effects of morphine and related drugs on the corticotrophin(ACTH)-stress reaction. *Prog. Brain. Res.* **39**, 361-372.
- Orosz, P., Echtenacher, B., Falk, W., Ruschoff, J., Weber, D., Mannel, D. N. (1993). Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **177**, 1391-1398.
- Rice, L., Laughter, A. H. and Twomey, J. J. (1979). Three suppressor systems in human blood that modulate lymphoproliferation. *J. Immunol.* **122**, 991-996.
- Shavit, Y., Lewis, J. W., Terman, G. W., Gale, R. P. and Liebeskind, J. C. (1984). Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. *Science* **223**, 188-190.
- Shen, M. L., Luo, Y. D., Hagen, K., Wu, Y. B. and Ou, D. (1994). Immunomodulating activities of cocaine-evaluation of lymphocyte transformation related to other immune functions. *Int. J. Immunopharmacol.* **10**, 311-319.
- Sklar, L. S. and Anisman, H. (1981). Stress and cancer. *Psychol. Bull.* **89**, 369-406.
- Solomon, G. F. (1969). Stress and antibody response in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **35**, 97-104.
- Solomon, G. F. and Amkraut, A. A. (1981). Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 155-184.
- Wistar, J. R. and Hildemann, W. H. (1960). Effect of stress on skin transplantation immunity in mice. *Science* **131**, 159-160.
- Wybran, J., Appelboom, T., Famaey, J. P. and Govaerts, A. (1979). Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* **123**, 1068-1070.
- Yeager, M. P. and Colacchio, T. A. (1991). Effect of morphine on growth of metastatic colon cancer *in vivo*. *Arch. Surg.* **126**, 454-456.
- Yoon, E. Y., Shin, J. S., Park, H. A., Kim, M. Y., Sunwoo, Y. and Han, H. M. (1994). The effect of methamphetamine on the immune organs and the antibody production. *J. Applied. Pharmacol.* **2**, 54-58.