J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 15, No. 1, pp. 27-34, 1999

마우스에서 반복적 저산소 스트레스 정도에 따른 면역독성 효과

강동원[1] · 김건태[2] · 김동구[2]*
[1]관동대학교 의과대학 약리학교실, [2]연세대학교 의과대학 약리학교실

Effects of Different Intensities of Repeated Hypoxic Stress on Immune Functions in Mice

Dong Won Kang[1], Gun Tae Kim[2] and Dong Goo Kim[2]*
[1]*Department of Pharmacology, College of Medicine, Kwandong University, Kangnung 210-701, Korea*
[2]*Department of Pharmacology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, 120-752, Korea*
(Received September 18, 1998)
(Accepted December 21, 1998)

ABSTRACT *: To study the nature of differentially manifested adaptive responses of an organism according to the intensities of the stress, the immune effects of different levels of repeated hypoxia were investigated. Four experimental groups (NH : not-handled, 20% : handled, 15% or 10% : exposed to 15% or 10% O_2 with balanced nitrogen, respectively) of mice were exposed to different levels of hypoxia for 60 min/day, 5 days/week in a repeated and intermittent manner. After 8 weeks' exposure to hypoxic environment, mice were subjected to immune function measurements. A decreased proportion of $CD3^+$ $CD8^+$ phenotype cells in the study of splenocyte subsets was observed in the 10% group. Ovalbumin-stimulated IgG2a production was increased in the 15% group, while no changes were noted in the IgG1 and IgM production. No significant changes of the antigen-stimulated splenocyte proliferation and the natural killer cell cytotoxicity were found. These results show that the stress effects on the immune systems can be varied according to the strength of the stress and that a mild level of repeated hypoxic stress can enhance the immune function of mice in this experimental model.*

Key Words *: Hypoxia, Repeated stress, Adaptation mechanism, Immune function, Splenocyte, Immunoglobulin, Subsets*

I. 서 론

스트레스(stress)는 생물체의 항상성을 위협하는 인자(stressor)와 그로 유도된 상황으로 정의된다(Chrousos와 Gold, 1992). 스트레스 환경에 노출된 개체는 항상성 유지를 위한 적응기전으로서 스트레스 대응축(stress axis)을 갖고 있으며 적절한 기능계 활성화를 통하여 스트레스 환경에 적응한다(Selye, 1946; Huether, 1996). 즉, 스트레스 노출은 개체의 여러 기능계의 기능 변동을 유발하며 그 중 면역계의 기능 변동은 대표적 예의 하나이다.

지속적 스트레스 상태를 보이는 우울증 환자의 경우 면역 기능의 저하가 관찰되었다는 보고(Irwin등, 1990; Maes 등, 1992)와 같이 스트레스는 개체의 면역 기능을 억제시키며(Irwin과 Livnat, 1987; Lewicki 등, 1988; Ferry 등, 1991) 감염성 질병과 종양성 질병에 대한 민감도를 증가시킨다(Cohen과 Williamson, 1991). 이와 같은 측면에서 스트레스는 면역계의 기능 이상을 일으키는 위해적 인자로 인식되고 있다. 그러나 스트레스의 면역계에 대한 효과가 반드시 억제적으로 작용하지 않고 반대로 개체의 면역기능을 증강시키기도 하였다는 연구도 일부 보고되고 있다(MacNeil과 Hoffman-Goetz, 1993; Wood 등, 1993; Dhabhar와 McEwen, 1996).

이와 같은 상반된 결과는 스트레스 자극의 종류와

*To whom correspondence should be addressed
LIST OF ABBREVIATION: NH, not handled; PBS, phosphate-buffered saline; PBST, phosphate-buffered saline-Tween 20; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescin isothiocyanate; R-PE, R-phycoerythrin; BSA, bovine serum albumin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; KLH, keyhole limpet hemocyanin; IFN-γ, interferon-γ; Th1, type 1 helper T cell; Th2, type 2 helper T cell;

자극의 크기 등 스트레스의 성격의 차이가 원인일 수 있음을 시사한다. 즉 개체에게 가해진 스트레스 환경이 개체가 효과적으로 적응할 수 있는가의 여부에 따라 서로 다른 결과가 나타난 것으로 생각된다. 그러나 대부분의 연구들은 서로 다른 스트레스 환경 노출하에서 억제 또는 증강의 한 방향만의 면역기능 변동을 보고하였으므로 같은 스트레스환경에서 스트레스 강도의 크기에 따라 개체가 상반된 면역기능 변동을 보일 수 있는지에 대해서는 일률적인 추론이 어렵다. 본 연구에서는 개체에 대한 스트레스의 효과는 주어진 스트레스 자극의 크기와 빈도, 그리고 이에 대한 개체의 적응 여부에 따라 기능 항진 또는 저하의 두 방향으로 모두 나타날 수 있다는 가설 하에, 개체가 성공적으로 적응할 수 있는 스트레스 자극에 대해서는 면역기능의 활성에 도움이 되는 방향으로 작용할 수 있을 것으로 생각하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 스트레스를 자극의 강도를 달리하여 개체에 노출시키고 이에 의하여 나타나는 개체의 면역계의 기능변동을 관찰함으로써 스트레스 자극의 크기에 따라 개체의 반응이 다르게 나타나는가를 알아보고자 하였다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물 및 실험군

실험동물은 SPF 환경에서 생육된 몸무게가 25 g 내외의 성숙한 수컷 BALB/c 마우스를 대한실험동물로부터 구입하여 이용하였다. 사육실은 20±1℃로 유지시켰으며 0700시부터 1900시까지 12시간 간격으로 명암이 조절되도록 하였다. 실험군은 다음의 네 군으로 나누었으며 실험군 당 10마리로 하여 실험을 진행하였다.

NH(not handled)군 : 사육장에서만 사육된 군

20%군 : 실험 환경에 노출되었으나 저산소에는 노출되지 않은 군
(20% 산소/80% 질소 가스에 노출)

15%군 : 15%의 저산소 환경 노출군
(15% 산소/85% 질소 가스에 60분간 노출)

10%군 : 10%의 저산소 환경 노출군
(10% 산소/90% 질소 가스에 60분간 노출)

2) 혈액 채취 및 혈청 분리

마우스를 ether로 마취시킨 후, 심장이 위치한 부위를 70% ethanol로 세척 및 소독하였다. Cardiac puncture를 이용하여 혈액을 무균 주사기에 채집하고 이를 상온에서 1시간 방치하여 원심분리한 후 상층의 혈청을 취하여 분석시까지 -70°C에 보관 후 실험에 사용하였다.

3) 비장세포 분리

마우스를 단두하여 즉시 70% ethanol로 몸 전체를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장을 금속 mesh에 통과시켜 잘게 만든 후, 다시 이를 pore 크기가 100 μm인 nylon mesh 위로 옮겨 통과시켜 비장세포를 얻었다. 이를 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI-1640 배양액(10% FBS-RPMI; Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 부유시켜 원심분리한 후 침전된 세포에 증류수를 침전 세포액만큼 가하여 적혈구를 제거하고 곧 2배 농도의 FBS-RPMI를 다시 가하여 등장액으로 만든 후 원심분리하였다. 침전 세포에 2 m*l*의 10% FBS-RPMI를 가하여 부유시킨 후 세포 수를 측정하여 실험 성격에 따라 적절한 세포 농도로 맞추어 실험에 이용하였다. 이후의 모든 실험은 실험 개체마다 비장세포 부유액을 만들어 각각에 대하여 면역기능 검사를 시행하였다.

2. 실험 방법

1) 저산소 환경 노출

저산소 환경 노출 상자는 가로, 세로, 높이가 420 cm × 370 cm × 250 cm이며 공기 주입구와 배출구를 제외하고는 외부와 차단된 형태로 만들었다. 주입구를 통하여 원하는 산소 분압에 맞도록 N_2/O_2가 일정 비율 및 일정 유속(flow rate)으로 맞추어 들어가도록 하였다. 주입된 혼합 기체 만큼의 동일 양의 공기는 배출구를 통하여 계속적으로 나가게 되며 상자 내의 온도와 압력도 대기압과 실내 온도와 동일하게 유지될 수 있도록 조절하였다. 저산소 환경 노출은 반복적 자극의 형태로 시행하였다. 즉, 노출의 빈도는 하루에 1회씩 일주일에 5일로 하였고 노출 기간은 8주간으로 1회 노출시간은 60분으로 하여 총 저산소 환경에의 노출시간은 40시간이 되도록 하였고 상자 내 산소 농도의 평형시간은 15분이었다.

2) 항원 투여

항원 특이항체 생성 및 항원 감작 증식능의 측정을 위하여 ovalbumin(chicken egg albumin, grade V; Sigma, Louis, MO, USA)을 항원으로 이용하여 항체 생성 및 항원 감작을 유도하였다. 즉 마우스 1마리 당 100 μg의

ovalbumin과 adjuvant로서 250 μg의 aluminium hydroxide gel(Alhydrogel 1.3%; Superfos Biosector a/s, Vedbaek, Denmark)을 0.4 m*l*의 인산완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 녹여 저산소 노출 5주째부터 1주 간격으로 3회 마우스의 등에 피하주사하였고 8주째에 면역기능 검사를 시행하였다. 비장 면역세포의 표현형 확인과 자연살 세포의 세포독성능 검사를 위한 각 실험군에 사용된 마우스에는 ovalbumin을 투여하지 않았다.

3) 면역기능 검사

(1) 비장 면역세포의 표현형 확인

비장세포 부유액을 tube 당 1×10^6개로 맞추어 tube에 옮긴 후 1% FBS가 포함된 RPMI-1640 배양액(1% FBS-RPMI)으로 2회 세척하였다. 이를 원심분리하여 침전시키고 침전된 세포를 50 μ*l*의 상층액과 함께 섞어 부유시킨 후 다음과 같이 시행하였다. 여기에 fluorescin isothiocyanate(FITC) 또는 R-phycoerythrin (R-PE)이 결합된 단클론항체(monoclonal antibody)를 tube 당 1 μg씩 넣어 암실에 두고 4°C 온도에서 45분 동안 반응시켰다. 이 때 R-PE로 결합시킨 단클론항체로 hamster anti-mouse CD3e, rat anti-mouse CD4 및 rat anti-mouse CD19 항체를, FITC로 결합시킨 단클론항체로 rat anti-mouse CD8a 항체를 사용하였다. 사용한 단클론항체는 모두 PharMingen(San Diego, CA, USA)사의 제품을 사용하였다. 반응이 끝난 tube에 다시 0.1% 우혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 포함된 ice-cold PBS(0.1% BSA-PBS) 3 m*l*를 가하여 2회 세척하고 원심분리하였다. 상층액을 50 μ*l*만 남기고 버린 다음 상층액과 침전 세포의 혼합 부유물에 200 μ*l*의 0.5% paraformaldehyde PBS 용액을 가하여 고정하였다. 이를 FACStar(Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용한 유세포 분석기(flow cytometry)로 비장세포 아군의 분포를 분석하였다.

(2) 항원 특이항체 생산 측정

저산소 노출 기간 동안 ovalbumin으로 감작시킨 마우스에서 분리한 혈청을 이용하여 혈청 내의 IgG1, IgG2a, IgM의 수준을 간접효소면역검사법(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하였다. 먼저, 10 μg/m*l* 농도로 carbonate 완충액(pH 9.6)에 희석한 ovalbumin을 100 μ*l*씩 round-bottom microwell plate의 각 well에 넣어 37°C에서 2시간 반응시켜 plate에 흡착이 되도록 하였다. 다음 0.05%(v/v) Tween 20이 포함된 PBS(PBST, pH 7.4)로 세척하여 흡착되지 않은 항원을 제거하고 1%(v/v) BSA가 함유된 PBST (1% BSA-PBST)로 37°C에서 1시간 blocking하고 PBST로 3회 세척하였다. 희석한 혈청 시료액 100 μ*l*를 각 well에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBST로 4회 세척하고 1 μg/m*l* 농도의 biotin이 결합된 rat anti-mouse IgG1(또는 IgG2a, IgM) 단클론항체(PharMingen, San Diego, CA, USA)를 100 μ*l*씩 가하여 상온에서 45분간 반응시켰다. 다시 PBST로 5회 세척 후 peroxidase가 결합된 anti-biotin goat 항체(Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 각 well에 넣어 상온에서 1시간 반응시켰다. 다음 citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)에 희석한 *o*-phenylenediamine-H_2O_2 기질 용액을 가하고 빛을 차단한 채로 10분간 상온에서 방치한 후 50 μ*l*의 2.5 N H_2SO_4로 반응을 정지시키고 분광 광도계(Spectra Max 340; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 각 well의 흡광도를 490 nm에서 측정하였다.

(3) 항원 감작 비장세포의 증식능 측정

비장세포를 96-well microculture plate에 well당 1×10^6 세포수가 되도록 하여 200 μ*l*씩 분주하고 항원 감작을 위해 ovalbumin을 well당 0.1, 1, 10 μg의 양이 되도록 10 μ*l*씩 가하였다. 대조 well로서는 ovalbumin을 넣지 않았고 각각의 농도를 달리하여 처치한 well을 3배수(triplication)로 하여 37°C, 5% CO_2 항온항습기에서 128시간 동안 배양하였다. 다음, 각 well 당 1 μCi/10 μ*l*의 [methyl-^{3}H]-thymidine(NEN, Boston, MA, USA; specific activity 2 Ci/mmol)을 넣어 16시간 배양한 후 세포 포집기(Skatron Instruments, Sterling, VA, USA)를 이용하여 fiber glass filter disc에 통과시켜 비장세포를 채집하였다. 채집된 비장세포의 방사능을 liquid scintillation counter(LS 5000 TA; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)로 측정하였다.

(4) 비장 자연살세포의 세포독성능 측정

비장세포를 주효세포로 하여 4시간-^{51}Cr 유리법으로 세포독성능을 측정하였다. 비장세포는 10% FBS-RPMI로 부유시켜 1×10^7/m*l* 농도로 준비하였다. 표적세포로는 자연살세포에 감수성을 가진 림프종 세포주인 YAC-1 세포를 이용하였다. 표적세포를 trypan blue 염색액(Sigma, Louis, MO, USA)으로 dye exclusion method를 시행하여 cell viability를 검사하여 90% 이상의 viability를 가진 것을 확인한 후 이 세포를 1×10^5/m*l* 농도가 되도록 10% FBS-RPMI로 맞추었다. 이 부유액을 원심침전(200×g, 10분)하여 상층액을 100 μ*l*만을 남기고 버린 다음 상층액과 침전세포를 섞어서 부유시켰다. 이 부유액에 100 μCi의 $Na_2{}^{51}CrO_4$(NEN, Boston, MA, USA)를 가하여 37°C 진탕 항온조에서

90분 동안 표지시켰다. 표지된 세포를 10% FBS-RPMI로 3회 세척한 후 동일 배양액으로 부유하여 다시 37°C에서 30분간 배양한 다음 10% FBS-RPMI로 최종액을 1×10^5/ml 농도가 되도록 하여 표지된 표적세포를 준비하였다. 표적세포는 well당 100 μl를 넣어 세포수를 1×10^4으로 하였고 주효세포 : 표적세포의 비율을 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1이 되도록 주효세포의 well당 세포수를 맞추고 10% FBS-RPMI로 나머지 양을 가하여 96-well microculture plate의 각 well에 투여한 최종 반응액의 양을 200 μl가 되도록 하였다. 최대 chromium 유리량을 구하기 위한 대조 well에는 표지된 표적세포 100 μl와 동일 용량의 5%(v/v) Triton X-100을 넣어 주었고, 자연 유리량의 계산을 위한 것은 표지된 표적세포 100 μl와 동일 용량의 10% FBS-RPMI로 구성하였다. 이 plate를 상온에서 2분간 200×g로 원심분리시킨 후 이 상태로 37°C, 5% CO_2 항온항습기에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 microculture plate를 원심분리(200×g, 10분)하고 상층액 50 μl를 취하여 gamma counter(Cobra II, Packard Instruments, Meridon, CT, USA)로 방사능을 측정하여 다음과 같이 비장 주효세포의 독성률을 계산하였다.

$$\text{세포 독성률}(\%)=\frac{\text{시료 유리량(cpm)}-\text{자연 유리량(cpm)}}{\text{최대 유리량(cpm)}-\text{자연 유리량(cpm)}}$$

3. 자료 분석

주어진 자료는 평균(mean)±표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표시하였으며, 실험군 사이의 통계학적 비교는 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 중 일방향 분산분석(one-way ANOVA)을 이용하였다. 이어서 다중비교분석 검사(multiple comparison test)로서 대조군과의 비교를 Dunnett법을 이용하여 시행하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 저산소 노출 정도에 따른 비장 면역세포 아군 분포

유세포 분석기(flow cytometer)를 통해 각 실험군의 세포를 10,000개씩 검사하여 10,000개 세포에서의 세포 아군의 분포를 검사하였다.

T세포 전체의 분포를 나타내는 $CD3^+$ 세포와 B세포의 분포를 의미하는 $CD19^+$ 세포의 경우 실험군 사이에 차이가 없었다. 보조 T세포의 표현형 검사($CD3^+$ $CD4^+$)

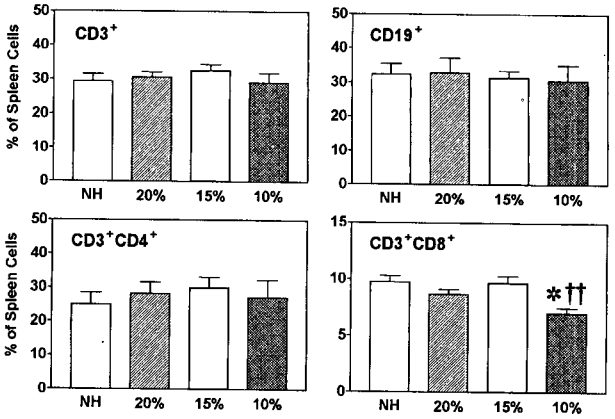

Fig. 1. Splenocyte subsets of mice after repeated exposure to different levels of oxygen. Immunophenotypic analysis was performed with flow cytometer using FITC- or R-PE-labelled monoclonal antibodies. The proportion of phenotypic cells was expressed as percentage of 10,000 spleen cells counted. Each group consisted of 7 animals. NH : not-handled group, 20% : group exposed to 20% O_2/80% N_2 gas, 15% : group exposed to 15% O_2/85% N_2 gas, 10% : group exposed to 10% O_2/90% N_2 gas. * : $p<0.05$ compared to the 20% group, † † : $p<0.01$ compared to the NH group by Dunnett's multiple comparison test.

에서도 실험군 사이의 차이는 보이지 않았다. 그러나, $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형을 가진 억제/세포독성 T세포의 경우 10%군의 분포율이 20%군 및 NH군에 비하여 감소하였다(각각 $p<0.01$, $p<0.05$)(Fig. 1). 보조 T세포와 세포독성 T세포의 비(CD4/CD8 ratio)는 NH군 2.9±0.3, 20%군 3.2±0.3, 15%군 3.1±0.2 및 10%군 3.3±0.5로 실험군 사이에 차이가 없었다.

2. 저산소 노출 정도에 따른 ovalbumin 특이항체 생성

ELISA 방법에 의하여 면역 글로불린 정도를 O.D. (optical density) 값으로 비교하였으며, 실험군에 따른 IgG1의 생성 수준은 실험군 사이에 차이가 없었다(Fig. 2A). 그러나, IgG2a의 생성 수준은 15%군에서 다른 실험군들보다 증가한 값을 보였다($p<0.05$; Fig. 2B). IgM의 경우 환경 노출군인 20%군이 NH군에 비하여 낮은 수준을 보였으나 20%군과 비교한 다른 저산소 노출군인 15%군과 10%군의 생성 수준은 차이를 보이지 않았다(Fig. 2C).

3. 저산소 노출 정도에 따른 ovalbumin 감작 비장세포의 증식능

Ovalbumin의 농도에 따른 비장세포의 ^{3}H-thymidine incorporation을 측정한 값으로 비교한 결과 ovalbumin의 *in vitro* 감작시 투여한 용량이 증가함에 따라 각 실

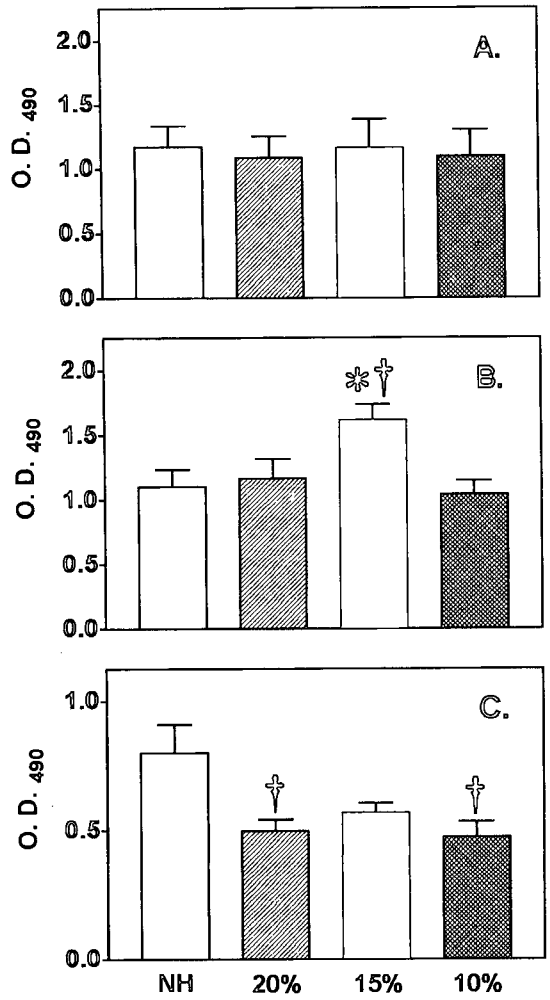

Fig. 2. Production of ovalbumin-specific antibodies from splenocytes of mice after repeated exposure to different levels of oxygen. Antigen-sensitization was done 3 times over a week interval by subcutaneous injection of ovalbumin. The concentration of immunoglobulin was expressed as an optical density at 490 nm measured by an indirect ELISA method. A : IgG1, B : IgG2a, C : IgM. Each group consisted of 9 animals. * : $p<0.05$ compared to the 20% group, † : $p<0.05$ compared to the NH group by Dunnett's multiple comparison test. Other legends are the same as Fig. 1.

험군의 ^{3}H-thymidine incorporation이 증가하였다. 그러나 각 ovalbumin 감작 농도에서 실험군 사이의 차이는 발견할 수 없었다(Fig. 3).

4. 저산소 노출 정도에 따른 비장 자연살세포의 세포독성능

표적세포인 YAC-1 세포에 대한 주효세포인 비장세포의 비율이 커짐에 따라 각 실험군에서 YAC-1의 용해율(% lysis)이 증가하였다. 일정 혼합 비율에서 비교하였을 때 각 실험군 사이의 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 4).

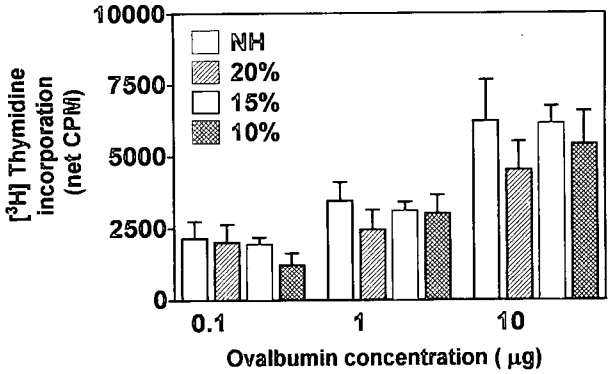

Fig. 3. Proliferation of ovalbumin-sensitized splenocytes of mice after repeated exposure to different levels of oxygen. The proliferation was measured by a ^{3}H-thymidine incorporation 16 hours after *in vitro* sensitization of spleen cells with ovalbumin. The values were expressed as net CPM. Each net CPM was calculated by subtracting the mean cpm of non-stimulated triplicate control from the mean cpm of ovalbumin-stimulated triplicates. Each group consisted of 8 animals. Other legends are the same as Fig. 1.

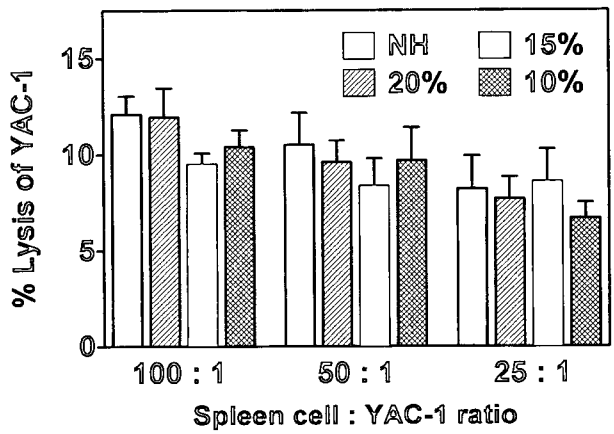

Fig. 4. The cytotoxicity of natural killer cells from spleen cells of mice after repeated exposure to different levels of oxygen. The activity of ^{51}Cr released from YAC-1 lymphoma cell line as a target cell during 4-hour reaction was expressed as % lysis. % Lysis was calculated from the difference in cpm of sample release and spontaneous release divided by the difference in cpm of maximal release and spontaneous release. Each group consisted of 7 animals. Other legends are the same as Fig. 1.

Ⅳ. 고 찰

스트레스 반응은 스트레스 자극에 대한 생물체의 적응과정의 결과이다. 그러므로 스트레스의 종류, 강도, 시간 및 스트레스가 가해지는 방식과 함께 스트레스에 대한 개체의 적응 기전에 따라 스트레스 반응의 양상이 결정된다(Kant 등, 1985; Dantzer와 Kelly, 1989; Pitman 등, 1990; Gaillet 등, 1991; Fricchione과 Stefano, 1994). 본 연구는 스트레스의 종류로서 저산소 스트레스를 선택하고 반복적 노출 방법을 이용하여 저자극성 스트레스 자극과 고자극성 스트레스 자극에 따른 면역

반응을 비교하였으며 스트레스 자극의 강도의 차이에 따라 면역반응이 서로 다르게 나타남을 관찰하였다. 본 연구의 실험 결과 저자극성 저산소 스트레스에 의해서는 ovalbumin 감작에 의한 IgG2a 항체 생성이 증가된 반면 고자극성 저산소 자극에 의하여는 $CD8^+$ 표현형 비장세포의 비율이 감소하였다.

IgG2a의 실험군 사이의 차이는 15%군에서 생성이 현저히 증가하고 10%군에서는 다시 대조군의 수준과 같아지는 양상을 보였는데 이와 같이 저자극성 스트레스군에서의 반응이 가장 강하게 나타나고 고자극성 스트레스에 의한 반응은 대조군의 반응과 비슷한 수준으로 나타나는 양상은 각 실험군 사이에 유의한 차이는 없었으나 세포아군의 표현형 검사, IgG1 및 IgM 항체 생성, ovalbumin 감작 비장세포 증식능 측정 결과 등에서도 유사하게 나타났다(Fig. 2 및 Fig. 3). 또한 세포아군의 표현형 중 $CD3^+$ $CD8^+$ 세포아군은 저자극성 저산소 스트레스 반응과 반대로 대조군에 비하여 더 감소하는 결과를 보였다. 이러한 사실은 본 연구의 전반적인 실험결과에 걸쳐서 스트레스 자극의 강도에 따라 면역반응이 다르게 나타나고 있음을 보여준다. 본 연구의 경우와 같이 동일하게 반복적 저산소 스트레스 자극을 이용하여 스트레스 자극의 강도만을 달리하여 스트레스에 의한 면역반응을 관찰한 보고는 없으나 유사한 예로 Rinner 등(1992)의 연구를 들 수 있다. 이들도 스트레스 자극의 강도를 달리 하였을 때 면역반응이 반대로 나타남을 보고하였는데, 이들은 흰쥐를 정해진 기간 동안 고정시킨 모델(immobilization stress)을 사용하여 동물의 말초혈액 림프세포의 T 및 B 세포에 대한 분열원(mitogen) 자극에 의한 증식능을 살펴본 결과 단지 1분간의 handling 스트레스만을 가한 경우 림프세포 증식반응이 증가하였으나 고정 스트레스에 의하여는 증식반응이 대조군에 비하여 감소하였고 고정기간이 길수록 더욱 감소하였다고 하였다. 그러나 이들의 실험은 스트레스 자극 방법으로서 고정 스트레스 모델을 이용함으로써 스트레스 자극의 강도를 스트레스가 가해지는 시간으로 정하였으므로 반응의 차이가 순수하게 자극의 세기에 의한 것인지 아니면 자극의 노출시간의 차이가 개재된 것인지 명확하게 구분되지 않으므로 본 연구와 같이 스트레스 강도 결정이 시간이 아닌 순수한 자극의 세기로 결정되지 않았다는 제한점이 있다.

이외에도 본 연구결과는 다음과 같이 두 가지 측면에서의 시사점을 제공하고 있다. 첫째, 실험군 사이에 유의하게 다르게 나타난 면역기능 변수가 스트레스 자극의 강도에 따라 서로 다른 항목이었다는 점이다. 즉 저자극성 스트레스에 의한 면역기능의 증가는 항체 생성능 측정에서 의의 있게 나타나 체액성 면역 항목이 감수성을 가진 것으로 나타난 반면, 고자극성 스트레스에 의한 면역기능 변화는 T세포 아군의 비율감소로서 세포성 면역 항목이 감수성 있게 나타났다. 둘째, 저자극성 및 고자극성 스트레스 자극에 대하여 특정한 면역기능의 변동만이 감수성 있게 나타났다는 점이다. 즉, 저자극성 스트레스의 경우 체액성 기능 변수 중에서도 IgG2a만이 감수성 있게 나타났으며 고자극성 스트레스의 경우 세포성 면역기능을 나타내는 변수 중에서도 $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형 T세포 아군 항목만이 유의성 있게 낮은 것으로 나타났다.

이와 같은 사실은 다른 강도의 스트레스 자극이 서로 다른 특정한 경로의 활성화를 매개하여 나타남으로써 서로 다른 면역기능 변동을 일으킬 수 있음을 시사한다. Carr 등(1992)은 마우스에 저온 스트레스(cold stress)를 반복적으로 가한 후 면양 적혈구(sheep) 특이 IgM 생성이 증가함을 관찰하였는데 아드레날린성 α 수용체 억제약물인 phentolamine은 이 효과를 봉쇄하였으나 β 수용체 억제약물인 propranolol은 봉쇄하지 못하였다고 하였으며 이와 같은 보고는 어떠한 스트레스 자극에 의한 면역기능 변동에 특이적 기전이 매개하고 있음을 보여준다. 본 실험에서 저자극성 저산소 스트레스에 의하여 면역항체(immunoglobulin)의 subclass 중에서도 IgG2a만이 증가한 것도 이와 같은 견지에서 풀이될 수 있다. 항체의 동종 항체 사이의 전환(isotype switching)은 싸이토카인(cytokine)의 조절 하에 이루어지고 있음이 알려져 있으며 IgM에서 IgG1으로의 전환은 제 2형 보조 T세포(Th2)에 의하여 분비되는 interleukin-4에 의하여, IgM에서 IgG2a로의 전환은 제1형 보조 T세포(Th1)에 의하여 분비되는 interferon-γ(IFN-γ)의 매개로 이루어짐이 알려져 있다(Finkelman 등, 1990; Noble 등, 1993; Saoudi 등, 1993). 그러므로 IgG2a의 생성이 저자극성 저산소 스트레스에 의하여 특이적으로 증가된 것은 저자극성 저산소 자극에 의한 면역기능의 증강 기전에 Th1 세포 매개에 의한 IFN-γ의 분비 증가가 개재될 가능성이 있다. 이와 유사한 예로 스트레스 자극으로서 흰쥐의 꼬리에 단기간의 피할 수 없는 전기 자극(inescapable tail shock)을 주고 keyhole limpet hemocyanin(KLH)에 대한 항체생성을 측정하여 항 KLH IgG 및 IgM이 장기간 감소하였으며 또한 IgG1의 감소는 없이 IgG2a만이 감소하였다고 하였다(Fleshner 등, 1996). 이와 같은 기전으로 본 실험에서도 IgG2a의 변동이 특이적으로 나타난 것으로 생각되며 보다 명확한 기전을 알기 위해서는 싸이토카인

의 생성능 또는 농도의 측정이 함께 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 glucocorticoids가 이러한 특이적 Th1/Th2 양상을 조절하는 인자로서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로(Wilckens와 De Rijk, 1997) 이 물질의 측정도 병행되어야 할 것으로 생각된다.

상기한 바와 같이 본 실험에서의 면역기능 변동은 고자극성 및 저자극성 자극에 의하여 각각 한 가지 항목에서만 유의한 변동을 관찰하였으나 자극의 강도에 따른 다른 면역기능 측정 변수도 유사한 경향을 보였다. 본 실험에서 이용한 저산소 자극의 강도는 저자극성과 고자극성 자극으로 구분하였으나 저산소 노출기간 동안 마우스가 저산소증을 일으킬 정도의 아주 강한 강도의 자극은 아니었다. 따라서 본 실험에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타난 IgG2a 항체생성 및 $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형 세포 아군의 분포율 변화는 저산소 자극에 의한 면역기능 변동항목 중 감수성이 어느 정도 높은 변수로 생각된다. 예로서 본 실험과 같이 반복적인 스트레스 자극 후 T세포의 수와 기능 변동을 조사한 연구에서도 $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형 세포수의 감소가 분열원 자극에 대한 T세포의 증식능과 같은 여러 측정 항목 중에서도 현저하게 나타난 변동 항목이었다(Batuman 등, 1990). 그러나 $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형 세포의 감소가 현저하게 나타난 의의에 대하여는 더 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 실험에서는 저자극성 강도의 스트레스를 반복 자극한 결과 면역 기능 변동이 증가하는 방향으로 나타났다. 최근 스트레스를 생물체의 기능을 억압하는 인자로만이 아니라 정상적 항상성을 유지하는데 있어서 적응과정을 활성화하는 인자로서도 보려 하고 있으며(Ottaviani와 Franceschi, 1996), 본 연구의 결과도 이러한 관점을 뒷받침한다. 또한 성숙 뇌에서도 환경 자극의 변화에 따른 신경 세포와 신경교 세포 사이 또는 신경 연접이 다시 이루어지는 신경 성형성(neuronal plasticity)이 이루어진다는 연구가 보고되고 있으며(Ramachandran, 1993; Rao 등, 1993; Theodosis와 Poulain, 1993), 이러한 보고들은 본 연구의 결과와 함께 적절한 스트레스 자극이 성숙한 개체에 있어서도 면역기능 증가와 같은 신체기능에 대하여 긍적적으로 작용할 수도 있음을 시사한다.

V. 결 론

마우스를 서로 다른 강도의 저산소 환경에 2개월간 반복적으로 노출시킨 결과 저자극성 저산소 스트레스에 의해서는 ovalbumin 감작에 의한 IgG2a 항체 생성이 증가된 반면 고자극성 저산소 스트레스에 의하여는 $CD3^+$ $CD8^+$ 표현형 비장세포의 비율이 감소하여 저자극성 스트레스와 고자극성 스트레스의 면역기능 변동이 서로 다르게 나타남을 관찰하였다. 즉, 스트레스에 의한 개체의 면역기능이 억제되는 방향으로만 나타나는 것이 아니라 스트레스 자극의 강도에 따라 달라질 수 있으며 저자극성 스트레스에 의하여 면역반응이 증가될 수 있음을 관찰하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부 지원 기초의학 학술연구조성비, 1997년도의 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구비의 지원에 감사드리는 바입니다.

참고문헌

Batuman, O.A., Sajewski, D., Ottenweller, J.E., Pitman, D.L. and Natelson, B.H. (1990): Effects of repeated stress on T cell numbers and function in rats, *Brain Behav. Immun.*, **4**, 105-117.

Carr, D.J., Woolley, T.W. and Blalock, J.E. (1992): Phentolamine but not propranolol blocks the immunopotentiating effect of cold stress on antigen-specific IgM production in mice orally immunized with sheep red blood cells. *Brain Behav. Immun.*, **6**, 50-63

Chrousos, G.P. and Gold, P.W. (1992): The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis, *JAMA*, **267**, 1244-1252.

Cohen, S. and Williamson G.M. (1991): Stress and infectious disease in humans, *Psychol. Bull.*, **109**, 5-24.

Dantzer, R. and Kelley, K.W. (1989): Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system, *Life Sci.*, **44**, 1995-2008.

Dhabhar, F.S. and McEwen, B.S. (1996): Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity, *J. Immunol.*, **156**, 2608-2615.

Ferry, A., Weil, B. Amiridis, I., Laziry, F. and Rien, M. (1991): Splenic immunomodulation with swimming-induced stress in rats, *Immunol. Lett.*, **29**, 261-264.

Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J. F. Jr., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman, R.L., Mosmann, T.R. and Paul, W.E. (1990): Lymphokine control of *in vivo* immunoglo-

bulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 303-333

Fleshner, M., Brennan, F.X., Nguyen, K., Watkins, L. R. and Maier, S.F. (1996): RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on *in vivo* anti-KLH immunoglobulin response. *Am. J. Physiol.*, **271**, R1344-1352.

Fricchione, G.L. and Stefano, G.B. (1994): The stress response and autoimmunoregulation, *Adv. Neuroimmunol.*, **4**, 13-27.

Gaillet, S., Lachuer, J., Malaval, F., Assenmacher, I. and Szafarczyk, A. (1991): The involvement of the noradrenergic ascending pathway in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretion is dependent on the nature of stressors, *Exp. Brain Res.*, **87**, 173-180.

Huether, G. (1996): The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function, *Prog. Neurobiol.*, **48**, 569-612.

Irwin, J. and Livnat, S. (1987): Behavioral influences on the immune system: stress and conditioning, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **11**, 137-143.

Irwin, M., Caldwell, C., Smith, T.L., Brown, S., Schuckit, M.A. and Gillin, J.C. (1990): Major depressive disorder, alcoholism, and reduced natural killer cell cytotoxicity, *Arch. Gen. Psychiatry*, **47**, 713-718.

Kant, G.J., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C.C., Drive, G.C. and Meyerhoff, J.L. (1985): Habituation to repeated stress is stressor specific, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **22**, 631-634.

Lewicki, R., Tahorzewski, H., Majewska, E., Nowak, Z. and Bag, Z. (1988): Effect of maximal physical exercise on T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL-1) and interleukin 2 (IL-2) production *in vitro*, *Int. J. Sports Med.*, **9**, 114-117.

MacNeil, B. and Hoffman-Goetz, L. (1993): Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice, *J. Appl. Physiol.*, **74**, 388-395.

Maes, M., Stevens, W., DeClerck, L., Bridts, C., Peeters, D., Schotte, C. and Cosyns, P. (1992): A study on the blunted natural killer cell activity in severely depressed patients, *Life Sci.*, **50**, 505-513.

Noble, A., Staynov, D. and Kemeny, D.M. (1993): Generation of rat Th2-like cells in vitro is interleukin-4 dependent and inhibited by interferon γ. *Immunology*, **79**, 562-567.

Ottaviani, E. and Franceschi, C. (1996): The neuroimmunology of stress from invertebrates to man, *Prog. Neurobiol.*, **48**, 421-440.

Pitman, D.L., Ottenweller, J.E. and Natelson, B.H. (1990): The effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats, *Behav. Neurosci.*, **104**, 28-36.

Ramachandran, VS. (1993): Behavior and magnetoencephalographic correlates of plasticity in the adult human brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 10413-10420.

Rao, B.S., Desiraju, T. and Raju, T.R. (1993): Neuronal plasticity induced by self-stimulation rewarding experience in rats - a study on alteration in dendritic branching in pyramidal neurons of hippocampus and motor cortex, *Brain Res.*, **627**, 216-224.

Rinner, I., Schauenstein, K., Mangge, H., Porta, S. and Kvetnansky, R. (1992): Opposite effects of mild and severe stress on in vitro activation of rat peripheral blood lymphocytes, *Brain Behav. Immun.*, **6**, 130-140.

Saoudi, A., Kuhn, J., Huygen, K., de Kozak, Y., Velu, T., Goldman, M., Druet, P. and Bellon, B. (1993): Th2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a Th1-dependent autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 3096-3103

Selye, H. (1946): The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation, *J. Clin. Endocrinol.*, **6**, 117-173.

Theodosis, D.T. and Poulain, D.A. (1993): Activity-dependent neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus, *Neuroscience*, **57**, 501-535.

Wilckens, T. and De Rijk, R. (1997): Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol. Today*, **18**, 418-424.

Wood, P.G., Karol, M.H., Kusnecov, A.W. and Rabin, B.S. (1993): Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats, *Brain Behav. Immun.*, **7**, 121-134.