

스트레스 상태의 고양이에서 lipopolysaccharide 투여가 혈중 감마글로불린 생산에 미치는 영향

나기정¹ · 이창우*

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소
서울대학교 수의과대학*

Effect of lipopolysaccharide administration on the production of serum γ -globulin in stressed domestic cats

Ki-jeong Na¹ and Chang-woo Lee*

¹College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract : The activated immune systems with lipopolysaccharide(LPS) were evaluated by γ -globulin levels in domestic cats. Especially, cats were in a stress condition, which was unfamiliar environmental change. Effect of continuous unfamiliar environmental stressor was a diminution of production of serum total globulin and γ -globulin on feline infectious peritonitis(FIP) vaccination. The γ -globulin production on FIP vaccination more increased in LPS treated groups than non-LPS treated group. Also, the γ -globulin production on FIP vaccination was maintained in LPS treated group under stress condition. These results imply that the γ -globulin can be produced under a stress condition by mitogen like as LPS.

Key words : γ -globulin, stress, LPS, cat

서 론

뇌에서 스트레스를 인식하게 되면 뇌하수체에서 부신피질자극호르몬이 분비되고 이로 인해 부신피질에서 cortisol, 18-hydroxycorticosterone, aldosterone, dehydroepiandrosterone 등이 분비된다. 이 중에서 cortisol이 주된 분비물이다². 체액중의 cortisol 농도는 동물과 사람에서 부신피질기능항진증과 부신피질기능저하증의 진단을 위해 측정될 뿐만 아니라 동물이나 사람에서 스트레스의 정도를 파악하기 위해서도 측정된다³. 염소에서 수송에 의한 스트레스⁹, 개와 고양이에서 피내반응 검사에 의한 스트레스^{8,17}, Chinese water deer에서 보정방법에 따른 스트레스 정도의 비

교¹⁰, 송아지에서 품종에 따른 보정 및 수송 스트레스의 영향¹⁹, 말에서 운동 스트레스¹⁶, 돼지에서 보정 스트레스에 대한 연령별 변화⁴, 그리고 개에서 전기자극 스트레스 등²⁰을 평가할 때 cortisol 농도의 변화를 그 지표로 사용하였다. 이렇듯 동물에서는 장기간에 걸친 수송이나, 보정과 같은 원인에 의해서 혈중 cortisol 농도가 증가하게 되고, cortisol에 의해서 면역기능이 억제된다. 즉, 장기간에 걸친 스트레스는 면역글로불린의 생성을 저하시킨다. 동물들이 보정이나 수송 및 환경변화 이후에 질병에 쉽게 이환되는 것은 cortisol에 의한 면역능 억제에 의한 것이다. 쉽게 질병에 이환되는 것은 동물의 생산력과 밀접하게 연관이 있고 이것은 경제적 손실로 직결되는 것이다.

스트레스에 대한 극복방법으로 제시되고 있는 것은 진정제의 투여로 동물이 외부의 자극에 대해 둔감해지도록 하는 것이다. 그러나, 이것은 장기간의 스트레스에 대한 극복방법으로는 부적절하고 면역능 강화에 의한 스트레스 극복방법에 대한 연구는 미흡한 상태

본 연구는 충북대학교 발전기금재단의 지원에 의해 연구되었음

¹Corresponding author.

이다. 고양이는 스트레스에 민감한 동물로 알려져 있고¹², 이러한 특징으로 인해 스트레스에 의한 면역능 관련실험에 자주 이용된다. 그리고, 세균의 내독소인 lipopolysaccharide(LPS)는 단핵구와 섬유아세포에서 IL-6를 생성하도록 자극하고, IL-6은 B 세포가 면역글로불린을 생성하는 것을 촉진시키는 역할을 한다¹¹. 즉, LPS에 의해 IL-6를 생성시키고 이로 인해 면역능을 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 스트레스에 의한 면역능 저하에 대한 극복방법을 정립하기 위한 연구의 일환으로 고양이에 비특이적인 면역활성화 물질을 투여하여 미리 활성화된 면역세포들이 스트레스 상태에서도 제대로 면역글로불린을 생산할 수 있는지 알아보기 위한 것이다. 나아가서는 스트레스에 의한 질병발생을 예방하는 기초를 마련하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

공시동물

임상적으로 건강한 체중 2-3.5 kg의 1-2년령의 21마리 고양이를 3개월 이상 환경적응을 위한 기초사육을 하여 실험동물로 사용하였다. 기초사육기간에는 3회 이상의 구충을 실시하였고, 실험을 시작하기 전에 신체검사와 임상병리학적 검사를 통해 건강 상태를 판정하였다. 고양이 전염성복막염(FIP) 바이러스에 대한 간접면역형광검사는 crandel feline kidney cell (CrFK)에서 TN-406 virus strain을 배양하여 제작한 kit(VMRD Inc, USA)로 실시하였다. 간접면역형광검사에서 모든 개체가 항체를 가지고 있는 것으로 나타났다. 그러나, FIP에 대한 어떠한 임상징후도 발견되지 않았다.

실험설계

실험동물은 Ectachem II(Kodak, USA)로 혈청검사를 하여 총단백질, 알부민, 글로불린의 값이 균일한

분포가 되도록 4개의 군으로 나누었다. 각각의 군에 대한 처치 및 표본 크기는 Table 1과 같았다.

LPS(phenol extracted preparation from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma Chemical Co, USA) 처치군은 FIP 백신(modified live, Mallinckrodt Veterinary, Japan)을 투여하기 12시간과 6시간 전에 각각 2회에 걸쳐 근육주사를 하였다. LPS는 생리식염수에 용해하였으며, 실험동물에는 10 µg씩을 주사하였다. 스트레스는 FIP 백신을 투여한 직후에 가하였으며, 고양이에게 낮은 환경을 적용하는 방법을 사용하였다. 스트레스를 가하는 군은 50×30×32(cm)의 케이지에 넣어 24시간 간격으로 계속해서 환경을 바꿨다. 채혈은 실험시작 10일째 즉, FIP 백신 투여한 후 8일이 되는 날에 실시하였다.

혈청단백질 검사

채혈한 혈액은 혈청을 분리하여 총단백질과 알부민을 Ectachem II를 이용하여 측정하고, 총글로불린은 총단백질에서 알부민 값을 빼는 방법으로 구하였다.

혈청단백의 전기영동

혈청단백의 전기영동은 Sephaphore X(cellulosic membrane)를 지지체로 하여 zone electrophoresis를 실시하였다. 완충액의 pH는 8.8인 Tris-barbital-sodium barbital을 사용하였다. 전기영동은 180 V에서 15분간하였고, 염색은 Ponceau S stain 500 mg을 7.5 % w/v Trichloroacetic acid 용액 100 ml에 녹여서 10 분간하였다. 탈색은 5 %의 초산용액에서 5분간씩 3회 실시하였고, 투명화는 polyethylene glycol(MW 400), methanol, 및 초산을 1 : 24 : 8의 비율로 혼합하여 10 분간 실시하였다. 마지막으로 cellulose acetate membrane의 건조는 80°C의 건조기에서 15분간하였다. 건조가 끝난 membrane은 densitometer(Gelman Inst Co, USA)로 525 nM에서 판독하였다. 전기영동 결과는

Table 1. Experimental design

Treatment	Sample size	Serum		
		total protein	albumin (mean±SD)	globulin
NS+Sal+FIP	4	7.25±0.39	3.35±0.26	3.90±0.17
NS+LPS+FIP	6	6.81±0.54	3.11±0.26	3.70±0.29
S+Sal+FIP	5	6.78±0.44	3.02±0.23	3.76±0.27
S+LPS+FIP	6	6.98±0.52	3.18±0.25	3.80±0.26

NS: non-stress, LPS: lipopolysaccharide, FIP: feline infectious peritonitis vaccine, S: unfamiliar environmental stress, Sal: saline

Table 2. Serum protein concentration after treatment

Treatment	Sample size	Serum total protein	Serum albumin	Serum globulin
		(Mean ± SD)		
NS+Sal+FIP	4	7.37 ± 0.39	3.35 ± 0.26	4.02 ± 0.19
NS+LPS+FIP	6	6.93 ± 0.43	3.11 ± 0.29	3.82 ± 0.26
S+Sal+FIP	5	6.90 ± 0.50	3.18 ± 0.29	3.72 ± 0.25
S+LPS+FIP	6	7.23 ± 0.61	3.36 ± 0.31	3.87 ± 0.30

NS: non-stress, LPS: lipopolysaccharide, FIP: feline infectious peritonitis vaccine, S: unfamiliar environmental stress, Sal: saline

Barta와 Arnold¹⁾의 기술에 따라 감마글로불린양을 산출하였다.

통계처리

각각의 군별 처치에 대한 변화는 다음과 같은 방법으로 산출하였다.

$$\frac{\text{군별처치에 따른 변화(\%)} = \frac{\text{실험시작 후의 값} - \text{실험시작 전의 값}}{\text{실험시작 전의 값}} \times 100$$

변화값들은 SPSS Inc의 통계프로그램인 SYSTAT 8.0을 이용하여 GLM을 실시하였다.

결 과

혈청 단백질의 변화

모든 군에서 혈청 총단백질 농도가 증가하는 경향

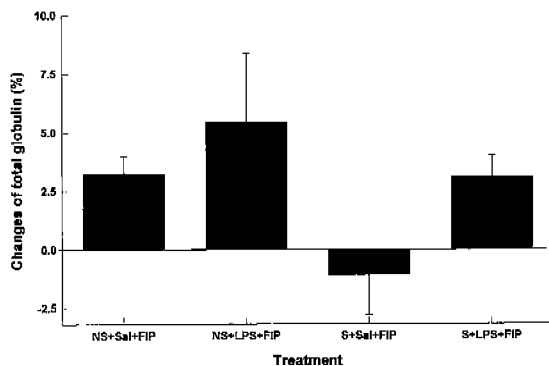


Fig 1. Changes of serum total globulin concentration between treatment of before and after. The values represent the mean ± SD of serum γ -globulin concentration. NS: non-stress, LPS: lipopolysaccharide, FIP: feline infectious peritonitis vaccine, S: unfamiliar environmental stress, Sal: saline.

을 보였으나 유의성은 없었다. 알부민도 변화가 없었다(Table 2).

총글로불린의 변화

실험 10일째의 군별 혈청 총글로불린의 변화는 Fig 1과 같았다. 실험 직전의 총글로불린과 실험 후의 총글로불린의 변화를 처치군간 비교하였다. 이때에 유의성있는 변화는 나타나지 않았다. 스트레스를 가하면서 FIP 백신을 접종한 경우는 실험시작 전보다 오히려 감소하였다. LPS를 전처치하고 FIP 백신을 접종한 경우는 다른 군에 비하여 가장 높은 증가율을 나타냈다. 그리고, LPS를 전처치하고 스트레스를 가하며 FIP 백신을 접종한 경우는 정상적으로 총글로불린이 증가하는 경향을 보였다.

감마글로불린의 변화

실험시작 전과 후의 감마글로불린 변화는 Fig 2와

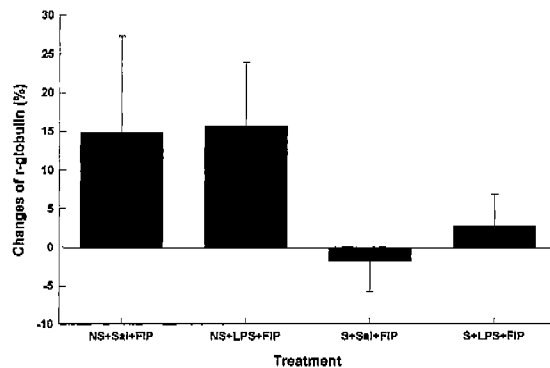


Fig 2. Changes of serum γ -globulin concentration between treatment of before and after. The values represent the mean ± SD of serum γ -globulin concentration. NS: non-stress, LPS: lipopolysaccharide, FIP: feline infectious peritonitis vaccine, S: unfamiliar environmental stress, Sal: saline.

같았다. 처치군간의 통계학적인 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 스트레스를 가하면서 FIP 백신을 투여한 경우의 감마글로불린의 양은 Fig 1에서와 같이 감소하였다. 스트레스 상태에서 LPS를 전처리하고 FIP 백신을 투여한 군에서는 미약하기는 하지만 감마글로불린의 생성이 이루어지고 있음을 알 수 있었다.

고 찰

백신접종의 실패 원인에는 모체이행항체, 선천적 또는 약물에 의한 면역억제, 영양, 스트레스 등이 있다. 이 중에서 면역형성에 영향을 주는 것으로는 마취, 수술, 높은 온도 등이 알려져 있으며, 스테로이드 호르몬을 실험적으로 투여하고 디스토펜백신을 접종하였을 때 임상증상은 나타나지 않았으나 면역형성이 늦게 이루어졌다는 연구도 있다⁶. 이때의 스테로이드 호르몬은 prednisone으로 강아지에 10 mg/kg씩을 1주일간 경구 투여하였었다. 고양이에서는 이와 유사한 유형의 실험결과가 없어서 비교하기는 힘들지만 개에서와 비슷한 결과를 예상할 수 있을 것이다. 고양이에서 실시한 여러 가지 스트레스 유형중에서 가장 강력하고 지속적인 것으로 확인된 낮선 환경 스트레스의 평균 혈중 cortisol 농도는 약 500 ng/ml이었다²¹. 스트레스를 실험기간 동안 지속적으로 가하면서 FIP 백신을 접종하였을 때 스트레스를 가하지 않은 군에 비하여 면역글로불린의 생산이 저하되는 경향을 나타내는 것을 본 연구의 실험에서도 확인할 수 있었다.

그람음성균의 내독소인 LPS는 패혈증을 일으키는 주된 원인체로 알려져 있다. LPS는 IL-1, TNF, IL-6 등의 생산을 유도한다. 이것을 *in vivo*로 투여하였을 때 IL-1 β 의 mRNA 발현이 1-2시간에 가장 높게 나타나고, 5시간이 경과하면서 감소하는 경향을 보인다^{5,15}. LPS는 반복 투여했을 경우에는 cytokine의 생산이 점점 저하된다. 이 중에서 IL-6과 TNF- α 는 크게 저하되지만 IL-1은 비교적 저하되지 않는 것으로 확인되었다. 즉 IL-1은 만성 염증반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다⁷. 그리고 IL-1, IL-6, TNF- α 는 염증반응이 있을 때 단핵구 및 탐식세포에 의해서 생성된다¹⁴. 특히 IL-6은 virus와 LPS에 의해서 단핵구와 섬유아세포에서 생성되어 B 세포가 면역글로불린을 생성하는 것을 촉진시킨다¹¹. 즉 LPS에 의해 IL-6를 생성시키고 이로 인해 면역능을 강화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

비특이적인 면역촉진제로 사용한 LPS는 염소에서 발열을 목적으로 20 μ g/kg의 용량으로 정맥주사를 하기도 하였으며²², 마우스에서 여러 가지 cytokine 유전자 발현을 알아보기 위하여 복강내로 25 μ g을 투여하기도 하였다¹⁶. 마우스의 복강으로 LPS를 투여하여 곧바로 IL-6의 증가를 확인하였으며, 24시간 후에 정상 수준으로 되돌아갔다고 하였다. 기니피에서도 20 μ g/kg 용량을 투여하여 IL-6와 TNF의 증가를 확인한 연구결과도 있다¹⁵. 그러나, 고양이에서 LPS를 투여하여 IL-6을 포함한 여러 가지 cytokine을 유도하기 위해서 얼마를 투여해야되는지에 대한 적절한 용량을 문헌검색을 통해 알 수는 없었다. 본 실험에서는 앞의 LPS 투여용량을 참고하여 고양이에 근육주사를 하고, 30분이 경과한 후의 직장체온을 0.8-1°C 상승시키는 용량을 고양이에 투여하였다.

실험 시작 직전과 10일째의 혈청을 전기영동한 결과 FIP 바이러스 감염에 의한 특징적인 전기영동상인 알부민을 증가하는 감마글로불린의 증가는¹³ 관찰되지 않았다. FIP 바이러스에 대한 항체가를 지니고 있었으나 임상징후를 나타내지 않는 점을 고려할 때 임상증상을 나타내지 않는 보균상태로 추정된다.

FIP 백신을 투여한 지 8일째의 총글로불린 양의 변화는 유의성이 없었다. 그러나, 스트레스를 가하고 FIP 백신만을 투여한 경우 대조군에 해당하는 실험 시작 직전의 총글로불린 양과 비교했을 때 오히려 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 그리고, 감마글로불린도 감소하는 경향을 나타냈다. 스트레스에 대한 면역글로불린의 감소는 Dhein과 Gorham이⁶ prednisone을 강아지에 투여하여 면역글로불린 생산이 억제됨을 확인한 것과 비교했을 때 미약한 수준일 수 있다. 그러나, 지속적이고 강도 높은 스트레스는 면역글로불린의 생성을 억제시킬 수 있음을 알 수 있다. LPS를 전처리하고 스트레스를 가하면서 FIP 백신을 투여하였을 때의 총글로불린과 감마글로불린은 LPS를 전처리하지 않았을 때 감소한 것과는 달리 대조군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 이것은 장기간의 스트레스에 의한 면역글로불린의 억제를 LPS와 같은 mitogen의 투여에 의해서 어느 정도는 극복할 수 있다는 가능성을 제시해 준다. LPS 대신에 다른 mitogen을 선택하여 투여 횟수를 변화시킨다면 보다 효과적인 면역글로불린의 생산 증가를 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 장기간에 걸친 스트레스는 혈청 총단백질 중에서 면역글로불린의 생성을 저하시키며, LPS와 같은 mitogen의 전처치는 이러한

면역글로불린의 생성저하를 막을 수 있을 것이다. 그리고, 스트레스를 받고 있는 동물에 어떤 종류의 백신을 접종하려고 한다면 면역증강제를 병용함으로써 백신접종의 실패를 막을 수 있을 뿐만아니라 질병의 발병도 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

고양이에서 강력한 스트레스 유형인 낮선 환경을 지속적으로 가하고 이것에 의한 감마글로불린의 변화를 관찰하였다. 그리고, 스트레스를 가하기 전에 LPS를 투여하였을 때 FIP 백신에 대한 감마글로불린의 변화도 관찰하였다. 이러한 실험을 통해서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고양이에서 낮선 환경 스트레스를 지속적으로 가했을 때 FIP 백신에 의한 감마글로불린의 생산은 감소되는 경향을 나타냈다.
2. LPS를 전처치하고 FIP 백신을 투여했을 때는 백신을 투여하지 않은 군뿐만 아니라 LPS를 전처치하지 않은 군보다도 감마글로불린의 생산이 증가되었다.
3. LPS의 전처치 후 스트레스 상태에서 FIP 백신을 투여하였을 때는 LPS를 전처치하지 않은 군과 스트레스를 가하지 않은 군에 비해서도 감마글로불린의 생산이 증가되는 경향을 보였다.
4. 스트레스를 받고있는 동물에 어떤 종류의 면역접종을 할 경우에 면역증강제를 병용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Barta O, Arnold DF. Electrophoresis. In: Veterinary Clinical Immunology Laboratory, 1st ed. USA: BAR-LAB Inc. 1993: C1-1-C1-17.
2. Baulieu EE, Kelly PA. Hormones. Hermann, Paris France: 1990: 387-437.
3. Benjamins C, Asscheman H, Scours AH. Increased salivary cortisol in severe dental anxiety. *Psychophysiology* 1992; 29(3):302-305.
4. Brown-Borg HM, Klemcke HG, Blecha F. Lymphocyte proliferative responses in neonatal pigs with high or low plasma cortisol concentration after stress induced by restraint. *Am J Vet Res* 1993; 54(12):2015-2080.
5. Dedrick RL, Conlon PJ. Prolonged expression of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory genes in whole blood requires continual exposure to LPS. *Infection and Immunity* 1995; 63(4):1362-1368.
6. Dhein CR, Gorham JR. Host response to vaccination. *Vet Clin North Am Small Anim Prac* 1986; 16(6):1227-1245.
7. Erroi A, Fantuzzi G, Mengozzi M, Sironi M, Orencole SF, Clark BD, Dinarello CA, Isetta A, Gnocchi P, Giovarelli M, Ghezzi P. Differential regulation of cytokine production in lipopolysaccharide tolerance in mice. *Infection and Immunity* 1993; 61(10):4356-4359.
8. Frank LA, Kunkle GA, Beale KM. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200(4):507-510.
9. Greenwood PL, Shutt DA. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust Vet J* 1992; 69(7):161-163.
10. Hastings BE, Abbott DE, George LM, Stadler SG. Stress factors influencing plasma cortisol levels and adrenal weights in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*). *Res Vet Sci* 1992; 53(3):375-380.
11. Hirano T. Interleukin-6. In: The cytokine handbook, 2nd ed. USA: Academic Press. 1991: 169-190.
12. Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 4th ed. USA: Lea & Febiger. 1986: 126-139.
13. Jain NC. Essential of veterinary hematology. 1st ed. USA: Lea & Febiger. 1993: 349-380.
14. Michel O, Ginanini R, Le Bon, Content J, Duchateau J, Sergysels R. Inflammatory response to acute inhalation of endotoxin in asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:352-357.
15. Roth J, McClellan JL, Kluger MJ, Zeisberger E. Attenuation of fever and release of cytokines after repeated injections of lipopolysaccharide in guinea-pigs. *J Physiol* 1994; 477(1):177-185.
16. Salkowski CA, Neta R, Wynn TA, Strassmann G, van Rooijen N, Vogel SN. Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection. *J Immunol* 1995; 155:3168-3179.
17. Willemse T, Vroom MW, Mol JA, Rijnberk A. Changes in plasma cortisol, corticotropin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone concentrations in cats before and after physical restraint and intradermal testing. *Am J Vet Res* 1993; 54(1):69-72.
18. Wong CW, Smith SE, Thong YH, Opdebeeck JP, Thornton JR. Effects of exercise stress on various immune functions in horses. *Am J Vet Res* 1992; 53(8):1414-1417.
19. Zavy MT, Juniewicz PE, Phillips WA, von Tungeln DL. Effect of initial restraint, weaning, and transport stress on baseline and ACTH-stimulated cortisol responses in beef calves of different genotypes. *Am J Vet Res* 1992; 53(4):551-557.

20. 나기정, 이창우. ELISA를 이용한 cortisol 측정법의 정립 및 임상적 응용. 대한수의학회지 1996; 36(3):731-741.
21. 나기정. 스트레스 유형에 따른 고양이 혈중 Cortisol 농도의 변화. 한국임상수의학회지 1998; 15(1):1-7.
22. 남치주, 권오경, 서강문. 반추동물에 있어서 침술의 진통 및 해열효과. 한국임상수의학회지 1994; 11(1):55-61.