

*In vitro*에서 cortisol이 개 말초혈액 단핵구세포의 증식에 미치는 영향

나기정¹ · 양만표
충북대학교 수의과대학

In vitro Effect of Cortisol on the Proliferation of Canine Peripheral Blood Mononuclear Cells

Ki-jeong Na¹ and Mhan-pyo Yang
College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University,
Cheongju, 361-763, Republic of Korea

ABSTRACT : *In vitro* effect of cortisol on the proliferation of canine peripheral blood mononuclear cells (MNC) was examined. The MNC was isolated from peripheral blood by a gradient centrifugation with Picoll-Hypaque. The cell proliferation assayed using a non-radioactive 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) kit. The MNC proliferated well in response to either phytohemagglutinin-p (PHA-P) or culture supernatant from MNC stimulated with PHA-P. However, these proliferative responses of MNC were not affected by addition of cortisol of 1 to 1,000 ng/ml. The addition of cortisol in MNC culture with either PHA-P or culture supernatant from MNC stimulated with PHA-P for 4 days was not also influenced on the viabilities of cultured MNC. In conclusion, it was able to assay the cell proliferation with BrdU instead of radioactive isotope e.g. tritiated thymidine (³H-TdR). These results suggested that cortisol does not at least influence on MNC proliferation *in vitro*.

Key words : BrdU, cortisol, MNC, PHA-P, proliferation

서 론

체액중의 cortisol 농도는 동물과 사람에서 부신피질 기능항진증과 부신피질기능저하증 등의 내분비성 질병의 진단을 위해 측정될 뿐만 아니라 또한, 스트레스의 정도를 파악하기 위해서도 측정된다³. 동물에서 수송이나 보정 스트레스^{5,6,8,9,16,17}, 그리고 개에서 전기자극 스트레스¹⁸ 등의 지표로 cortisol 농도의 변화를 사용하였다. 패혈증 상태에서 단핵구로부터 생산되는 interleukin(IL)-1과 tumor necrosis factor(TNF)- α 는 혈압저하, 발열, 설사 등을 일으키는데, 스트레스 지표로 사용되는 cortisol은 단핵구의 이러한 IL-1 및 TNF- α 의 생성을 억제시키고, 또한 B세포의 항체생성이나 탐식세포의 탐식능까지도 저하시키는 것으로 알려져 있다^{2,11}. Glucocorticosteroid는 natural killer 세포의 활성을 저하시키고¹³, T 세포의 IL-2 생산 및 분화도 억제시키기도 한다^{4,5}. 그리고, *in vivo*에서 cortisol은 림프구 감소증과 호중구 증가증을 주로 일으킨다. 이러

한 변화는 대부분의 동물에서 일어나며 특히 개와 고양이에서 일치된 의견이다^{10,14}.

이상의 고찰에서 cortisol은 면역기능 저하를 일으키는 것으로 사료되지만 cortisol이 *in vitro*에서 혈액 단핵구세포의 증식에는 어떤 영향을 주는지 명확하지 않다. 따라서, 본 연구는 cortisol이 *in vitro*에서 개 말초혈액 MNC의 증식에 영향을 주는지를 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물

건강한 12개월령의 비글견 2두를 공혈동물로 하였다.

시약

RPMI 1640(Sigma, USA)배지에 0.3 g/l의 L-glutamine 및 10 mg/ml의 gentamicin을 첨가하였다.

실험에 사용된 cortisol(hydrocortisone; Sigma, USA)은 에탄올에 2 mg/ml이 되도록 녹인 다음 0.2 μ m의 millipore filter(Whatman, England)를 통과시켰다. 준비

¹Corresponding author.

된 cortisol 용액은 4°C에 보관하였으며 사용할 때는 RPMI 1640 배지로 희석하였다.

PHA-P(Difco, USA) 원액은 10 mg/ml로 4°C에 보관하였으며 희석은 RPMI 1640 배지로 하였다.

MNC의 분리

헤파틴을 항응고제로 하여 말초혈액을 경정맥에서 채혈하였다. 이것을 비중 1.077의 Picoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden)와 중층한 다음 400×g로 40 분간 비중차 원심분리하여 MNC를 분리하였다.

MNC의 배양상층액 제조

MNC는 2×10⁶ cell/ml이 되도록 하고 PHA-P를 25 µg/ml이 되게 첨가하여 37°C의 가습된 5% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. 그후 배양액을 1500×g로 원심하여 상층액을 분리하였다.

MNC의 배양 및 증식반응

분리된 MNC는 10% Fetal Bovine Serum(Gibco BRL, USA) 함유 RPMI 1640 배지로 현탁시켜 96-well microplate(Nunc, Denmark)에 소정의 cortisol 및 PHA-P, 또는 PHA-P로 배양한 MNC 배양상층액을 첨가하여 최종 세포밀도가 well당 1×10⁵ cells이 되도록 하여, 37°C의 5% CO₂ 가습 조건에서 96시간 배양하였다. 배양한 MNC의 증식상태 측정은 5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) labeling and detection kit III(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였으며, 배양완료 12시간 전에 BrdU labelling 용액을 첨가하였다. 배양이 끝난 후 세포를 고정시키고 nuclease로 처리하였다. 그후 peroxidase가 결합되어 있는 monoclonal anti-BrdU를 넣어 30분간 반응시킨 후 ABTS를 기질로 하여 발색반응을 실시하였다. 세포 증식상태는 microplate reader(Model 550; Bio-Rad, USA)를 이용하여 490 nm를 대조로 하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cortisol 처리

MNC의 증식반응에 대한 cortisol의 효과를 관찰하기 위하여 여러 가지 조건에서 MNC를 배양하였다. MNC는 1×10⁵ cell/well이 되도록 하고 여기에 1~1,000 ng/ml의 cortisol을 첨가하여 배양하였다.

MNC의 viability

배양 4일째에 각각의 처치군에 대한 MNC의 viability는 Trypan blue dye(Sigma, USA) exclusion test로 실시하였다.

통계

MNC의 증식변화 및 viability에 대한 결과는 평균 ±표준편차로 표시하였으며 Student's t-test로 검증하였다.

결 과

Cortisol을 0에서 1,000 ng/ml 첨가하여 4일간 배양한 MNC는 무처리 대조군에 비해 cortisol 농도 변화에 따른 증식 또는 억제 변화가 인정되지 않았다(Fig 1). T 림프구의 증식을 유도하는 mitogen인 PHA-P을 첨가하여 MNC의 증식반응을 관찰한 결과(Fig 2)

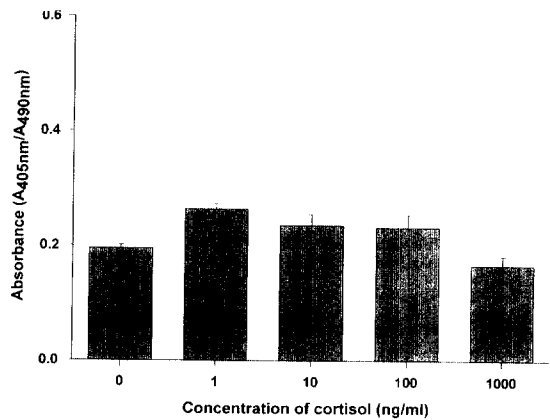


Fig 1. Effect of cortisol on canine MNC proliferation was examined after incubation of 96 hours. There was no changes of MNC proliferation according to cortisol concentration. The vertical bar represents standard deviation.

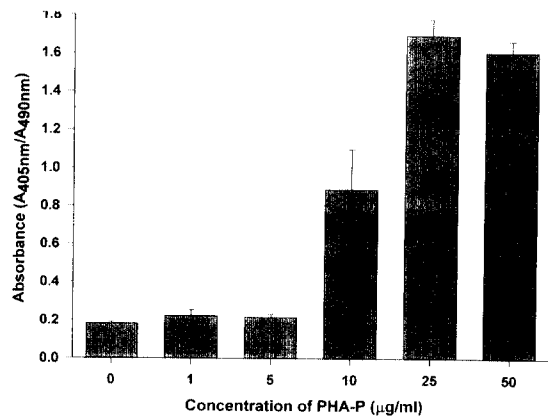


Fig 2. Proliferative response of canine MNC to PHA-P. PHA-P initiated MNC proliferation at 10 µg/ml. The maximum proliferation of MNC was at the PHA-P concentration of 25 µg/ml.

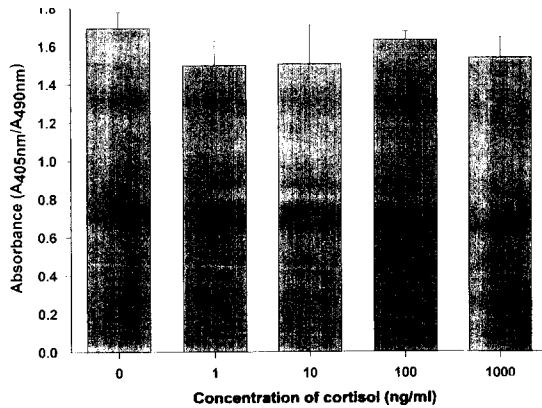


Fig 3. Effect of cortisol on the proliferative response of canine MNC to PHA-P(25 µg/ml). There was no changes of MNC proliferation according to cortisol concentration.

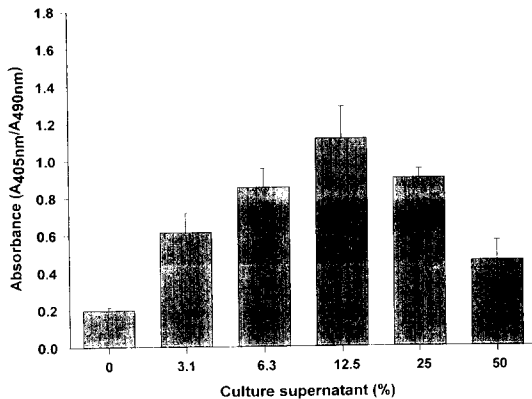


Fig 4. Proliferative response of canine MNC to culture supernatants from MNC stimulated with PHA-P for 48 hours. The culture supernatant induced proliferation of canine MNC.

PHA-P의 첨가 농도에 의존해서 세포증식이 일어났으며 특히 대조군에 비하여 25 µg/ml에서 최대의 증식 반응을 보였다($p < 0.05$). 이와같이 MNC의 증식반응이 인정된 PHA-P(25 µg/ml)를 첨가하여 MNC의 증식반응에 대한 cortisol 효과를 보았다(Fig 3). Cortisol 농도 0에서 1,000 ng/ml 범위내의 어떤 농도에서도 대조군에 비해 유의한 증감상태가 인정되지 않았다. 다음은 T 림프구 증식인자인 IL-2를 비롯한 여러 가지 cytokines을 함유하고 있는 PHA-P 자극 MNC 배양상층액의 존재하에 MNC의 증식을 검토하였다⁷. PHA-P 자극 MNC 배양상층액의 농도증가에 의존해서 MNC의 증식반응(Fig 4)이 인정되었으나($p < 0.05$), 이 배양상층액 25%에 대한 MNC의 증식반응에 있어서 cor-

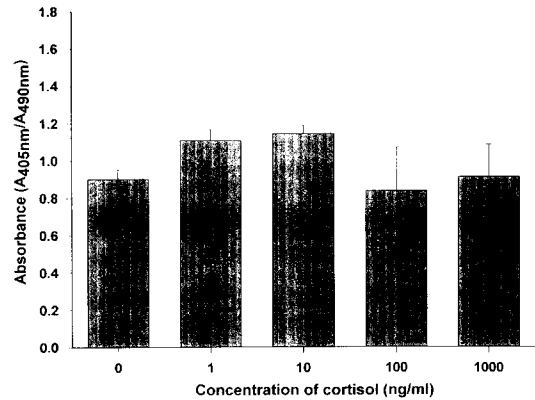


Fig 5. Effect of cortisol on the proliferative response of canine MNC in culture supernatant (25 %) from MNC stimulated with PHA-P (25 µg/ml) for 48 hours. Cortisol did not induce suppression of MNC proliferation.

Table 1. Viability(%) of MNC cultured with cortisol for 4 days

Cortisol	Unstimulated MNC	PHA-P-stimulated MNC	Culture supernatant of PHA-P-stimulated MNC
0	70.3±6.4*	63.8±4.6	69.3±6.0
1	74.5±8.9	64.3±5.0	69.3±6.1
10	73.5±8.3	61.0±7.2	73.3±6.1
100	70.8±3.8	62.0±2.6	69.8±7.0
1,000	73.8±7.8	63.5±4.7	70.8±8.3

*: mean ± SD, n=3

tisol 농도변화에 따른 MNC의 증식변화는 인정되지 않았다(Fig 5). PHA-P 및 PHA-P 첨가 MNC 배양상층액의 존재하에 cortisol의 농도를 변화시키고 4일간 배양한 MNC의 viability를 조사한 결과(Table 1), 98% 이상의 배양전 MNC의 viability는 배양 4 일째에는 무처리 대조세포에서는 평균 75%였으며, 처치세포들에 있어서는 전체적으로 65% 전후를 나타냈다. 그러나 각 군에서 cortisol 농도변화에 따른 viability의 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

고 찰

세포증식을 측정하는 방법으로 기존에는 [³H]-thymidine(³H-TdR)을 이용한 DNA의 합성을 측정하는 것이 일반적이었다. 그러나 BrdU가 ³H-TdR을 대신해서 cytochemistry나 flowcytometry analysis와 같은 영역에서 사용되었으며, cell ELISA를 이용한 세포증식 측정

에도 사용되게 되었다¹². 본 연구에서는 방사성 물질을 이용한 세포증식 상태의 측정시 그 위험성과 불편함 등으로 인해 새롭게 개발된 BrdU를 이용하여 세포증식을 측정하였다.

Cortisol은 스테로이드 호르몬으로 이에 대한 수용기는 MNC의 세포질에 존재하고 수용기에 결합한 cortisol은 핵에 작용한다¹⁵. 돼지 새끼에 보정 스트레스를 가하여 혈중 cortisol 농도가 높은 군과 낮은 군으로 나눈 다음, 각군에서 림프구를 분리해 내어 PHA, concanavalin A(Con A) 또는 pokeweed mitogen(PWM)를 첨가하였을 때의 증식반응을 비교한 연구에서 혈중 cortisol 농도가 높았던 군은 낮은 군에 비하여 림프구의 증식반응이 미약하게 일어났다⁵. 그러나 본 연구에서는 PHA-P로 MNC를 자극하고 고농도의 cortisol을 첨가하여 배양한 경우에도 cortisol 농도에 따른 MNC의 유의성있는 증식변화는 없었다. 이것은 종이 다르다는 점도 있을 수 있지만, 림프구에 작용하는 cortisol의 환경에 의해서 다른 반응이 일어날 수 있다는 점이다. 예를 들면 생체내·외의 차이 또는 MNC의 cortisol 수용기에 대해 cortisol의 결합으로 mitogen 자극에 대한 MNC 세포질내의 proliferation signal의 차단 등이 일어났을 가능성을 배제할 수 없다.

In vitro에서 cortisol의 면역세포에 대한 영향은 크게 두 가지로 나뉘어 이루어진다. 첫째는 세포 독성에 의한 세포파괴와 둘째로는 이들 세포에서 분비되는 여러 가지 물질의 생성을 억제하는 것이다¹⁵. U937 세포주를 사용한 결과에서는 cortisol에 의한 반응은 아주 민감하여 100 ng/ml 에서도 monocyte의 부착능력과 IL-1 β 의 mRNA의 생성이 감소하였다². 본 연구에서는 PHA-P 첨가 MNC 배양상층액에서 MNC의 증식이 일어났다. 이것은 PHA-P로 자극한 MNC 배양상층액에는 MNC로부터 분비되는 IL-2가 포함되어 있기 때문이다⁷. 그러나 자신의 IL-2로 증식을 유도시키고 cortisol을 첨가하였을 때 MNC 증식상태의 변화는 관찰되지 않았다. 그리고 MNC를 PHA-P로 직접 자극한 경우에도 cortisol에 의해 증식상태의 변화는 없었다. 이것은 cortisol이 in vitro에서 blastogenesis에도 영향을 주지 않는다는 것을 시사하고 있다. 본 연구에서는 정상세포인 배양 MNC의 viability는 대조군에서도 배양 4일째에 감소하여 평균 75% 이하를 나타냈으며, PHA-P 또는 PHA-P를 첨가하여 배양한 MNC 배양상층액을 첨가한 모든 MNC의 viability는 전체적으로 65% 전후를 나타냈다. 이것은 mitogen 및 cytokines에 의한 자극으로 세포대사가 빨라져서 생긴 것으로 생각되었다. Cortisol을 첨가하지 않은 PHA-P 및 PHA-

P 첨가 MNC 배양상층액중의 viability는 1,000 ng/ml의 고농도 cortisol에서의 viability와 비교했을 때 차이가 없는 것으로 보아 전체적인 viability의 저하는 cortisol에 의한 세포독성은 아닌 것으로 판단되었다. 이러한 사실은 cortisol이 적어도 in vitro에서 MNC의 증식과 viability에 영향을 주지 않는 것으로 사료되었다. 그러나 in vivo에서 처럼 cortisol이 in vitro에서 MNC의 분화 및 성숙을 억제하거나 또는 B 림프구의 항체생산을 감소시키거나, MNC로부터의 cytokines의 생성 및 발현 등을 억제시키는지의 여부는 계속적인 연구가 필요하다.

결 론

In vitro에서 cortisol이 개 말초혈액 단핵구세포(MNC)의 증식에 관여하는 지를 검토하였다. Cell proliferation assay는 기존의 방사성 동위원소인 [³H]-thymidine이 아닌, 비 방사성 물질인 5-Bromo-2'-deoxy-uridine(BrdU) kit로 assay할 수 있었다.

Mitogen 무첨가 MNC의 증식은 cortisol 첨가와 상관없이 증식반응을 보이지 않았다. PHA-P를 첨가하여 MNC를 4일간 배양한 결과 첨가농도의 증가에 의존해 증식반응을 나타냈으며, 이에 대한 cortisol의 첨가배양은 MNC 증식에 아무런 영향을 주지 못하였다. 또한 PHA-P로 2일간 배양한 MNC 배양상층액(interleukin-2 등을 포함)을 첨가하여 배양한 결과, MNC는 배양상층액의 농도증가에 의존하여 증식하였다. 이 경우에도 cortisol은 배양상층액 첨가에 의한 MNC의 증식반응에 있어서 증감효과는 인정되지 않았다. 그리고 상기에서 증식반응이 인정된 PHA-P 또는 PHA-P 첨가 MNC 배양상층액에 의한 MNC의 반응에 있어서도 cortisol이 MNC의 viability에는 영향을 미치지 못하였다.

이상으로부터 비 방사성인 BrdU로도 충분히 cell proliferation assay를 할 수 있었으며, 상기의 결과로부터 cortisol은 적어도 in vitro에서는 개 말초혈액 단핵구세포의 증식반응에 전혀 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Baulieu EE, Kelly PA. Hormones. Paris: Hermann. 1990: 387-437.
2. Baybutt HN, Holsboer F. Inhibition of Macrophage differentiation and function by cortisol. Endo 1990; 127(1): 476-480.
3. Benjamins C, Asscheman H, Scuurs AH. Increased

- salivary cortisol in severe dental anxiety. *Psychophysiology* 1992; 29(3): 302-305.
4. Blecha F, Baker PE. Effect of cortisol *in vitro* and *in vivo* on production of bovine interleukin 2. *Am J Vet Res* 1986; 47(4): 841-845.
 5. 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): 2015-20.
 6. 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.
 7. Gillis S, Crabtree GR, Smith KA. Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production, I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 1979; 123(4): 1624-1631.
 8. Greenwood PL, Shutt DA. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust Vet J* 1992; 69(7): 161-163.
 9. 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.
 10. Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 4th ed. USA: Lea & Febiger. 1986: 126-139.
 11. Kuby J. Immunology. 2nd ed., USA: W. H. Freeman and Co. 1994: 300-321.
 12. Magaud JP, Sargent I, Mason DY. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J Immunol Methods* 1988; 106: 95-100
 13. McGlone JJ, Lumpkin EA, Norman RL. Adrenocorticotropin stimulates natural killer cell activity. *Endocrinology* 1991; 129(3): 1653-1658.
 14. Meyer DJ, Coles EH, Rich LJ. Veterinary laboratory medicine: Interpretation and diagnosis. 1st ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1992: 27-41.
 15. Tizard I. Drugs and other agents that affect the immune system. In: Veterinary immunology. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1996: 470-478.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 나기정, 이창우. ELISA를 이용한 cortisol 측정법의 정립 및 임상적 응용. *대한수의학회지* 1996; 36(3): 731-741.