

나일틸라피아의 흉선과 말초 혈액내 림프구에 미치는 Glucocorticosteroid 호르몬의 효과

장선일 · 조재윤

부산수산대학교 양식학과

Effects of Glucocorticosteroids on the Thymus and Peripheral Lymphocytes of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

Seon-II JANG and Jae-Yoon JO

Dept. of Aquaculture, National Fisheries University
of Pusan, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

Effects of glucocorticosteroids (GCS) on the thymus and peripheral lymphocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* were examined. Young fish (5-7g) were injected into intraperitoneal cavity with various dose of dexamethasone (DEX) or hydrocortisone (HC). Histology of thymus and thymocyte counts in treated fish were compared to normal ones. The results showed that in vivo administration of DEX or HC induced weight loss of thymus and reduction of thymocytes, and both of these were dose and time dependent. In vivo treatment of thymocytes with 10 mM DEX or 10 mM HC for 12hrs caused DNA fragmentation. Both drugs could split the DNA into fragments of about 180-200 base pair multiples. There was no change in granulocytes of peripheral blood due to the treatment of DEX or HC with various length of time. In contrast, treatment of DEX or HC for 2-3 days decreased number of peripheral lymphocytes.

The results indicate that the thymocytes and circulating lymphocytes would respond to GCS depending on several factors, such as nature of the hormone, dose, and duration of treatment.

서 론

스트레스는 생물 개체의 생리 및 면역 체계에 영향을 미쳐 개체 내 항상성을 교란시키므로써 생체 내외의 질병원에 쉽게 노출되는 원인이 된다. 어류는 수생 환경 내의 다양한 스트레스 요인에 접하게 되는데, 갑작스런 환경의 변화를 받게 되면 생체내 adrenal corticosteroid 호르몬의 양이 증가된다

(Davis and Parker 1990 ; Pickering 1992). 생체내 corticosteroid가 증가되면 탐식 세포의 탐식능 저하 (Flory an Bayne 1991)와 순환하는 림프구의 수적 감소(Garrido et al. 1989) 등 면역 세포의 기능에 크게 영향을 주는 것으로 최근에 보고되었다. Saad (1988)는 cortisol 호르몬이 어류에 있어서 생리 및 면역 체계에 심각한 영향을 미치는 것을 지적하였으며, Davis와 Parker (1990)는 농어에서 수온에 따른 cortisol의 분비량을 조사한 결과 저온과 고온에서 크게 그 양이 증가됨을 확인하였다. 이와 같이 스트레스에 의한 어류의 생체내 cortisol level이 증가되면, 말초 혈액내의 백혈구 뿐만 아니라 면역 기관의 세포에도 큰 영향을 주어 lymphopenia를 유발하므로써 많은 질병원에 노출된다 (Houghton and Matthews 1990).

스트레스의 대표적인 호르몬의 하나인 glucocorticosteroid (GCS)는 포유동물 뿐만 아니라 양서류의 면역 세포에 있어서 항원 결합 능력의 억제와 흉선 세포 및 비장 세포수의 감소를 초래하고, 특히 흉선 세포에 있어서는 endonuclease가 활성화 되면서 DNA가 절편화되고 chromatin이 응축되어 세포가 조직내로부터 사라지는 현상인 apoptosis를 유발시키는 것으로 알려졌다 (Garrido et al., 1987, 1989). 어류에 있어서는 흉선에 이들 호르몬이 영향을 주어 흉선 세포의 수와 흉선의 무게를 감소시키는 원인이라는 점이 알려 졌지만 (Ghoneum et al. 1986), 이들 현상에 대한 상세한 기전은 전혀 알려진 바가 없다.

본 연구는 GCS의 일종인 dexamethasone과 hydrocortisone을 치어 시기의 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)에 주사하여 호르몬의 양과 시간에 따른 흉선 조직내 세포의 변화와 시험관내 흉선 세포가 apoptosis 과정을 경유하는지 조사해 보고, 말초 혈액내 림프구의 수적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 어류

실험 어류는 부산수산대학교 양어장에서 사육하고 있는 나일 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)로, 충분히 성숙된 1kg 이상되는 암컷 두마리와 수컷 한마리의 친어로부터 생산된 5-7g 치어 100여 마리를 본 실험에 사용하였다. 치어는 301 수조(수온 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)에서 수용하여 2주간 통상적으로 사용되는 잉어용 치어 사료 2호로 사육하여 실험 조건에 적응시킨 다음 glucocorticosteroid (GCS) 호르몬의 투여에 따른 효과를 실험하였다.

생체내 호르몬 투여

Dexamethasone (1,4-pregnien-9-fluor-16 α -methyl-11 β , 17 α 21-triol-3, 20-dione, Sigma)와 hydrocortisone (11 β , 17 α , 21-trihydroxypregn-4-ene-3, 20-dione, Sigma)등 호르몬을 10 m을 1 ml ethanol에 녹여 호르몬 농축액을 제조하였다. 생체내 호르몬의 투여 농도는 5-7g되는 치어 1 마리당 호르몬 농축액을 L-15 배양액 (Gibco) 으로 희석하여 1, 5, 10, 20 mM/0.1 ml 등 4 가지 농도로 복강에 주사한 다음 101 수조 (수온 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 에서 용존산소가 5-6 ppm이 되게 하여 수용하였다. 10 mM GCS로 선택하여 1, 2, 3, 5일 등 여러 시간별로 처리하여 시간에 따른 GCS의 효과를 조사하였다. 대조군은 L-15 배양액 (pH 7.2)과 호르몬 농도별 실험시 사용되는 ethanol의 양을 복강에 주사하여 실험군과 비교하였다.

나일틸라피아의 흉선과 말초 혈액내 림프구에 미치는 Glucocorticosteroid 호르몬의 효과

시험관 내 호르몬 투여

치어 3-4 마리로부터 흉선을 적출한 다음 안과용 가위로 잘게 세절한 후 L-15 배양액을 첨가하여 세포 부유액을 만들었다. 세포 부유액은 30 μ m nylon mesh로 통과시켜 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics가 함유되어 있는 L-15 배양액으로 1,000 rpm에서 3회 원심 세척하였다. 흉선 세포는 1×10^7 cell/ml이 되게 적정한 다음 dexamethasone과 hydrocortisone의 농도를 10^{-6} M이 되게 하여 26 $^{\circ}$ C 항온에서 12 시간 처리하였다.

조직 표본

호르몬이 처리된 치어를 대상으로 흉선을 주의 깊게 적출하여 ethanol series에서 탈수시킨 다음 파라핀에 매몰시켜 조직 표본을 제작하였다. 조직이 매몰되어 있는 파라핀은 5 μ m 간격으로 절편하여 hematoxylin eosin으로 염색한 후 400 X 현미경 시야에서 검경한 다음 흉선내 세포의 조직학적 소견을 관찰하였다.

DNA 추출 및 전기 영동

호르몬이 처리된 흉선 세포 (1×10^7 cell/ml)를 DNA 추출에 사용하였다. DNA 추출은 Park (1990)의 방법에 준하여 실험하였다. 요약하면, 흉선세포에 2.5 ml의 nuclear lysis buffer (10mM Tris-HCl pH 7.6, 2M EDTA pH 8.0, 400mM NaCl)을 가하고, 10% SDS (sodium dodecyl sulfate, Sigma)와 100 μ l의 proteinase K (10 mg/ml, Sigma)를 첨가한 후 50 $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 방치하였다. 여기에 6 M NaCl을 첨가하고 3,000rpm으로 20 분간 원심 침전시켜 상층액을 취하고 상층액에 ethanol을 가하여 1 시간 동안 방치한 후 15,000 rpm으로 원심 침전시켜 DNA pellet을 얻었다. 건조시킨 DNA pellet에 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0)을 가하고 DNA pellet을 녹인 후 260 nM와 280 nM의 spectrophotometer (Beckman, Du-7) 하에서 O.D.값을 측정하였다. O.D.값이 1.7 이상인 DNA 표본만 전기 영동에 사용하였다. 전기 영동은 ethidium bromide (10 mg/ml, Sigma)가 첨가된 1.8% agarose gel에서 전개하였다. DNA 양은 4 μ g씩 동일하게 loading하여 1 시간 동안 전개시켰다. DNA size maker는 Hae III로 절단시킨 ϕ ×174 DNA(BRL)을 사용하였다.

말초 혈액 표본

호르몬이 처리된 나일 틸라피아 치어의 미병부를 절단하여 슬라이드에 혈액을 한방울 떨어 뜨린 다음 도말하여 상온에서 60 분간 방치후 혈액 표본을 제작하였다. 혈액 표본은 May-Gruwald 염색 및 Giemsa 염색 (Gibco) 등 이중 염색 방법으로 염색하여 1,000 X 현미경 시야에서 검경하였으며, 적혈구 5,000 개당 총과립 백혈구와 림프구수를 계산하여 GCS 호르몬이 말초 혈액내 백혈구의 수적 변화에 미치는 영향을 조사하였다.

통계 처리

실험한 결과는 student's t 검정 방법에 의하여 유의성 검사를 하였고, 유의성의 한계는 $P < 0.05$ 로 정하였다.

결 과

GCS 투여 양과 기간에 따른 흉선 무게의 변화

치어 시기의 나일 틸라피아에 있어서 GCS 투여양과 기간에 따른 흉선 무게의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자, dexamethasone (DEX)와 hydrocortisone (HC)의 농도를 각각 1, 5, 10, 20 mM 등 여러가지로 하여 2일간 투여한 후 흉선을 적출하여 그 무게를 측정된 결과 Fig. 1에서 나타낸 바와 같다. 대조군의 무게를 $100 \pm 8\%$ 라 간주했을 때, 10 mM의 DEX와 HC 농도에서 흉선의 무게가 각각 $51 \pm 7\%$ ($P < 0.005$)와 $40 \pm 3\%$ ($P < 0.005$)로 현저히 감소했으며, 20 mM에서는 각각 $20 \pm 8\%$ ($P < 0.001$)와 $18 \pm 7\%$ ($P < 0.001$)로 크게 감소 되었다. 호르몬 투여 기간에 따른 흉선의 무게 변화를 측정하기 위하여 DEX와 HC의 농도를 10 mM로 정하여 1, 2, 3, 5일간 여러 시간별로 처리하여 흉선을 적출하여 그 무게를 측정하였다. Fig. 2에서와 같이 호르몬이 처리된 후 2일에 있어서 DEX처리군에서 $51 \pm 7\%$ ($P < 0.005$), HC 처리군에서 $40 \pm 3\%$ ($P < 0.005$)로 현저히 감소되었고, 3일에 있어서도 현저한 감소가 지속되었다. 그러나, 5일째에는 흉선의 무게가 DEX 처리군에서 $43 \pm 4\%$ ($P < 0.005$), HC 처리군에서 $55 \pm 10\%$ ($P < 0.005$)로 나타나 회복되는 경향을 보였다. DEX와 HC간에는 큰 차이가 없었다.

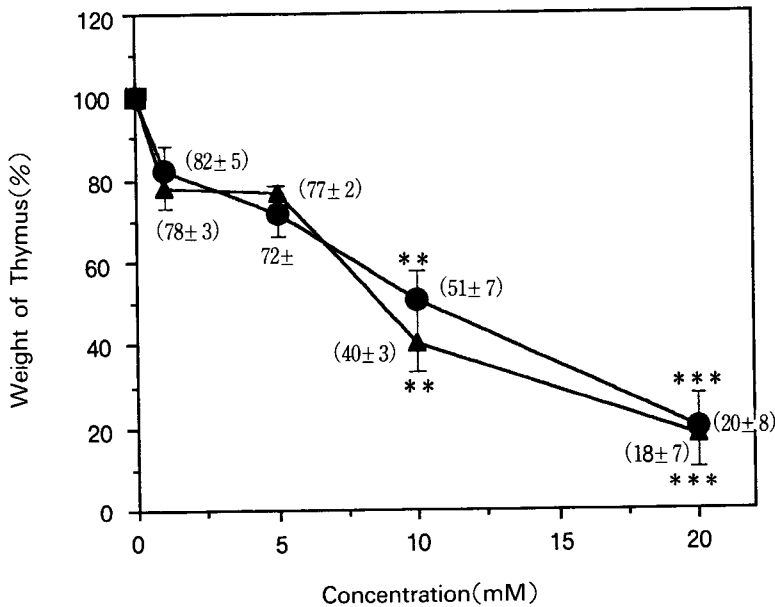


Fig. 1. Effects of glucocorticosteroids on the weight of Nile tilapia thymus. Fish were treated with several concentration of dexamethasone and hydrocortisone for 2 days. Fish were sacrificed and immediately measured the thymus weight.

■ - control ; ● - dexamethasone ; ▲ - hydrocortisone

Values were the mean ± SD from 5 fishes.

** P<0.005, *** P<0.001

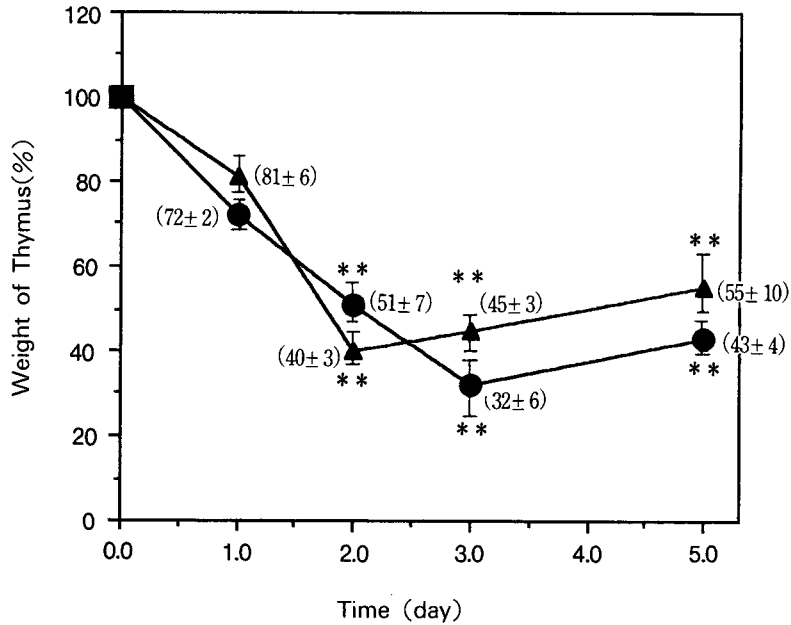


Fig. 2. Effects of glucocorticosteroids on the weight of Nile tilapia thymus. Fish were treated with 10 mM dexamethasone and 10 mM hydrocortisone for various length time. Fish were sacrificed and immediately measured the thymus weight.

■ - control ; ● - dexamethasone ; ▲ - hydrocortisone

Values were the mean ± SD from 5 fishes.

** P<0.005

GCS 투여에 따른 흉선내 세포 수의 변화

DEX와 HC가 흉선 조직내 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 치어 1 마리당 이들 호르몬의 농도를 10 mM로 정하고 복강에 주사하여 2일간 방치한 후에 흉선을 적출한 다음 조직학적 소견을 관찰하였다. Fig. 3에서와 같이 대조군 (Fig. 3A)에서는 흉선 세포가 밀집되어 있었으며, 인두 상피 세포 열을 따라서 흉선막에 둘러 쌓여 있었다. 흉선 세포 내에는 분비 세포가 관찰되었다.

DEX (Fig. 3B)와 HC (Fig. 3C)에서는 멜라노 대식 세포의 출현이 증가된 반면, 흉선 세포의 수는 현저히 감소되었다. 또한 이들 호르몬이 처리된 치어로부터 흉선을 적출하여 세포 부유액을 만든 다음 세포수를 조사한 결과 Fig. 4에서 나타난 바와 같다. L-15 배양액 또는 L-15 배양액과 ethanol를 처리한 대조군에서는 각각 $(5.9 \pm 0.7) \times 10^4$ cells/ml과 $(5.5 \pm 0.5) \times 10^4$ cells/ml인데 비해서 DEX와 HC가 처리된 실험군 중 2 일에는 각각 $(4.2 \pm 0.4) \times 10^4$ cells/ml과 $(3.6 \pm 0.3) \times 10^4$ cells/ml로 현저히 감소되었고 (P<0.005), 3 일에는 각각 $(2.6 \pm 0.5) \times 10^4$ cells/ml과 $(2.4 \pm 0.8) \times 10^4$ cells/ml로 크게 감소되었다 (P<0.005).

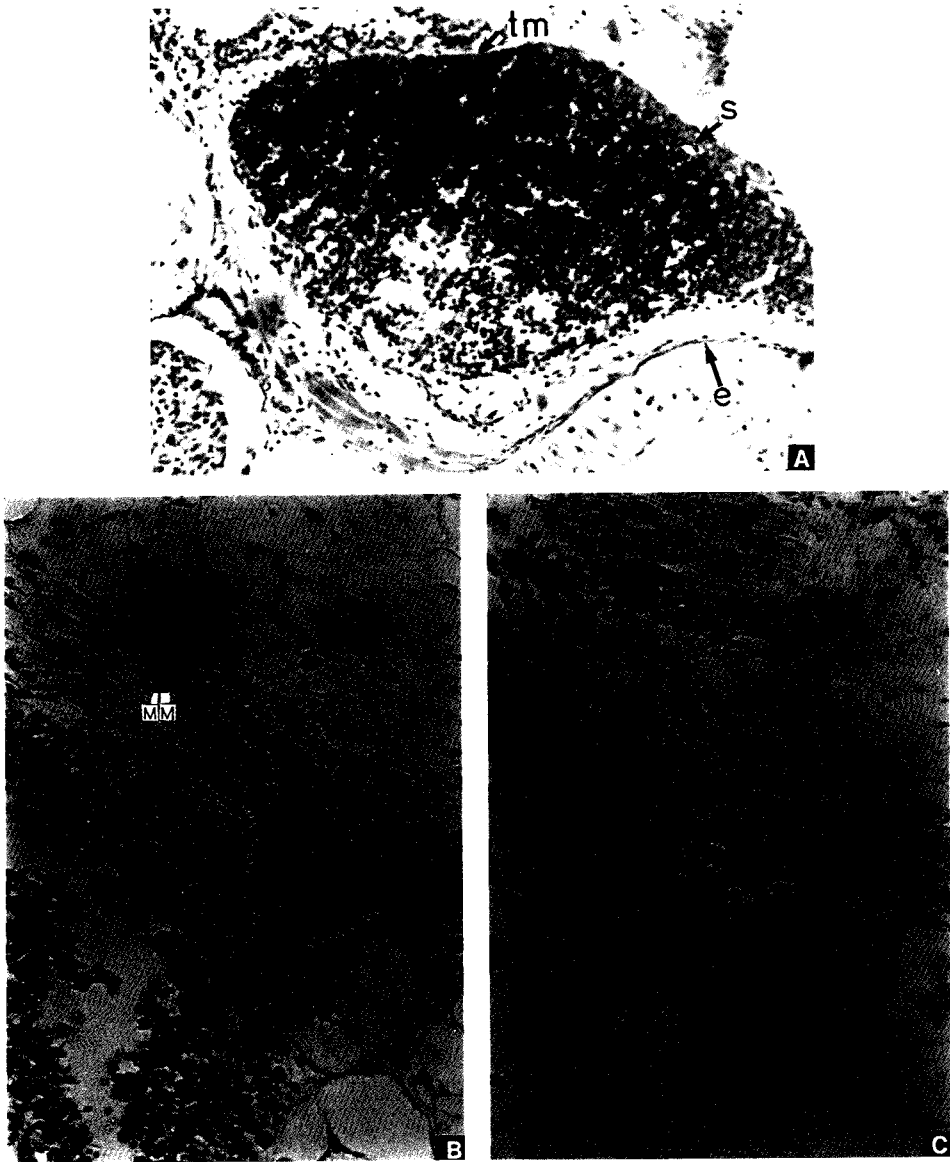


Fig. 3. Microscopic finding of Nile tilapia thymus treated glucocorticosteroids. a wax embedded section of young fish (5-7g) thymus to show the secretory cells along the thymic membrane (tm), and the rest of the pharyngeal epithelium (e).

MM—melanomacrophage ; A—control ; B—10 mM dexamethasone ;
C—10 mM hydrocortisone. Hematoxylin -Eosin stain. $\times 400$.

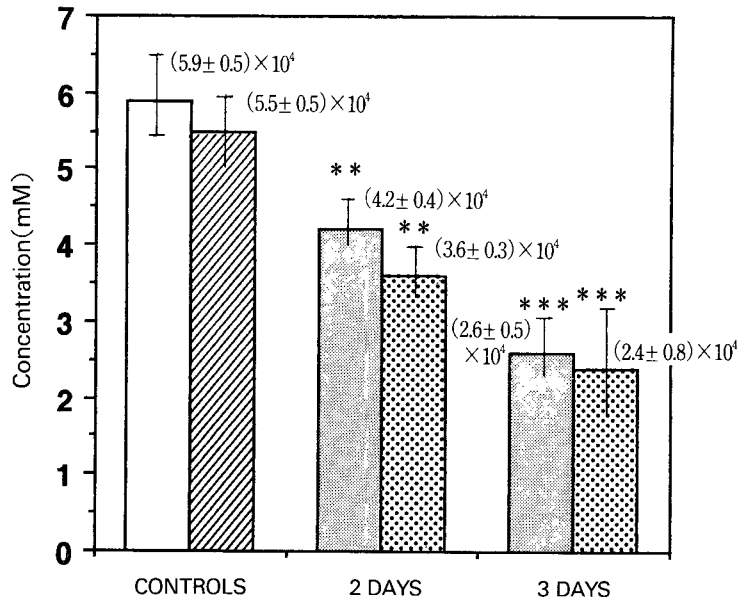


Fig. 4. Effects of glucocorticosteroids on thymocyte population in Nile tilapia thymus. Fish were treated with 10 mM dexamethasone and 10 mM hydrocortisone for 2 and 3 days.

□ - L-15 medium alone ; ▨ - L-15 medium plus ethanol
 ■ - dexamethasone ; ▤ - hydrocortisone ;

Values were the mean \pm SD from 5 fishes.

** P < 0.005, *** P < 0.001

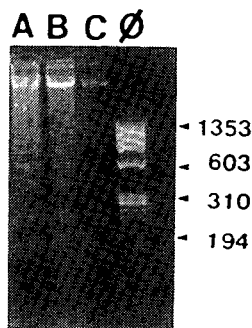


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from thymocytes. Cells (1×10^7 /ml) were treated with 10^{-6} M dexamethasone (A) and 10^{-6} M hydrocortisone (B) or without (Control, C) for 12hrs. DNA was extracted from each group and 4 μ g was applied to 1.8% agarose gel. Lane ϕ was $\phi \times 174$ digested with Hae III.

GCS가 유도하는 DNA 절편화

DEX가 HC가 시험관 내 흉선 세포의 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위해 이들 호르몬의 농도를 10^{-6} M로 하여 세포 부유액 (1×10^7 cells/ml)에 처리한 후 12 시간 경과시 흉선 세포로부터 DNA를 추출하여 전기 영동한 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 이들 호르몬이 처리된 나일 틸라피아 흉선세포는 DNA가 180-200 염기쌍으로 다양하게 절편화 되어 나타남을 확인할 수 있었다.

GCS 투여에 따른 말초 혈액내 림프구 수의 변화

DEX와 HC의 농도를 10 mM로 하여 2 일간 나일 틸라피아의 복강에 투여한 후 말초 혈액내 림프구 수를 조사한 결과는 Table 1에서와 같다. 말초 혈액내 림프구와 과립 백혈구의 관정은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 과립을 가진 백혈구 (Fig. 6B, C의 화살표)를 과립백혈구라 하고, Fig. 6A의 화살표에서 나타난 바와 같은 혈구를 림프구라 한 후에 적혈구 5,000 개당 이들의 세포수를 세어 수적 변화를 조사하였다. 호르몬 처리 시간에 따라서 과립 백혈구의 수는 큰 변화가 없었던 반면, 림프구는 유의성 있게 감소했다. 대조군의 림프구는 141.5 ± 10.4 개 였으나, DEX 처리군에서는 2 일과 3 일에 각각 $118.7 \pm 10.7\%$ ($P < 0.05$)와 $114.4 \pm 9.8\%$ ($P < 0.005$)로 감소하였고, HC의 경우 1 일째 $118.4 \pm 11.7\%$ ($P < 0.05$)로 감소하였으며 2 일과 3 일째에는 DEX 처리군과 비슷하게 감소하였다. 호르몬 처리 5 일에는 림프구의 수가 대조군의 경우와 비슷하게 회복되는 경향을 보였다.

Table 1. Effects of glucocorticosteroids on numbers of circulating lymphocytes in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*.

Treatment day	Dexamethasone ^a		Hydrocortisone ^a	
	No. of lymphocytes	No. of granulocytes	No. of lymphocytes	No. of granulocytes
0	141.5 ± 10.4^b	14.7 ± 3.1^b	141.5 ± 10.4^b	14.7 ± 3.1^b
1	123.6 ± 15.1	13.1 ± 4.1	$118.4 \pm 11.7^*$	14.3 ± 2.8
2	$118.7 \pm 10.7^*$	12.0 ± 1.2	$110.8 \pm 10.1^{**}$	12.4 ± 2.4
3	$114.4 \pm 9.8^{**}$	11.0 ± 3.4	$111.4 \pm 10.1^{**}$	12.7 ± 1.9
5	130.4 ± 13.1	13.4 ± 2.4	129.4 ± 9.8	13.9 ± 3.1

^a : 10 mM dexamethasone or hydrocortisone/fish (5-7g).

^b : Number of lymphocytes or granulocytes/5,000 erythrocytes.

Each value represents the mean \pm SD of 5 fish. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

고 찰

어류의 흉선은 림프구의 발달에 있어서 중요한 역할을 하는데, 포유동물에서 발견되는 여러가지 특징 중 몇가지 특이한 점이 발견된다. 즉, 어류의 흉선에는 항체를 생산 (Ortiz-Muniz and Sigel 1971) 할 수 있는 것과 관련되어 있는 면역글로브린의 출현 (Warr et al. 1977)과 흉선피질과 수질의 경계가 뚜렷하지 않고 아가미와 인두상피열을 따라서 두부상 위에 위치되어 있는 점이 포유 동물의 흉선의 특징과 크게 다르다 (Ellis 1977). 본 연구에서 나일 틸라피아의 흉선 조직을 관찰한 바 조직학적 소견은 Fig. 3A에서와 같이 흉선은 인두열을 따라서 위치되어 있으며, 흉선 세포내에 분비

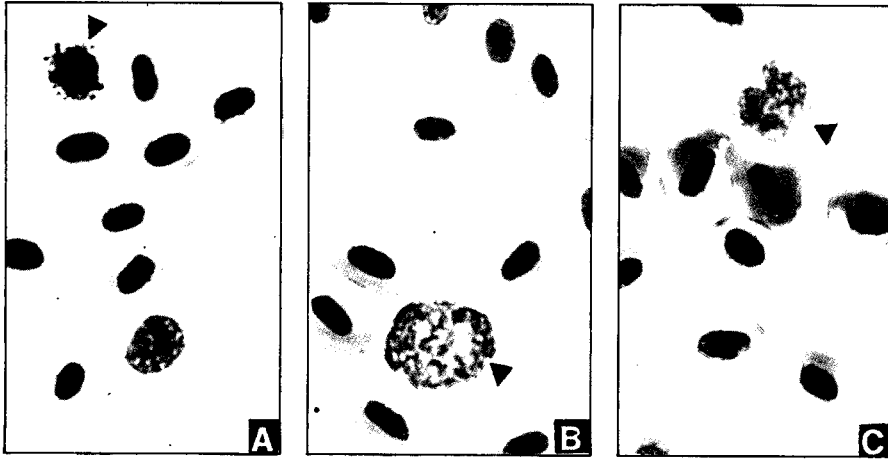


Fig. 6. Peripheral blood cells of Nile tilapia stained by May-Gruwald and Giemsa staining solution. Arrow of A plate : lymphocyte ; Arrows of B and C plate : granulocyte ; cells of the rest : erythrocytes. $\times 1,000$.

세포가 관찰되었고, 인두상피세포에 의해 둘러 쌓여져 있는 것이 관찰되었다. 이 결과는 연어류와 잉어류에서 관찰된 바와 매우 유사하였다 (Grace and Manning 1980 ; Tatner 1982 ; Secombes et al. 1983).

Tatner와 Manning (1985)는 무지개송어에서 흉선을 발달을 연령별로 조사한 결과 어체중에 비해 흉선의 무게가 가장 많이 증가하는 시기는 부화 후 2-3달 경이었으며, 그 이후에는 점차 감소되는 현상을 보고 하였는데, 이러한 현상은 연령에 따른 마우스 흉선의 퇴축 현상과 매우 유사하다(장 1992). 이와같이 흉선은 생물체가 나이를 먹게 됨에 따라 퇴축되는데, 본 연구에서는 나일 틸라피아 5-7g치어 (부화 후 2달)를 대상으로 스트레스 호르몬 중의 대표적인 GCS 호르몬을 사용하여 인위적으로 흉선의 퇴축 정도를 조사하였다.

Fig. 1과 2에서 나타낸 바와 같이 GCS의 농도와 시간에 따라 나일 틸라피아 흉선의 무게가 크게 감소되었으며, 흉선 세포에 있어서도 그 밀도가 현저히 감소되었다 (Fig. 3B, C). 또한 10 mM의 GCS을 2-3일간 처리한 치어에서 흉선을 적출하여 세포수를 조사한 결과 그 수가 현저히 감소되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). Ghoneum (1986)등은 송사리에 corticosteroid 호르몬을 물 11당 0.1, 1, 10 mg 등 여러가지 농도에서는 7일만에 모두 치사되었으며, 그 이하의 농도에 있어서는 치사되지 않았지만 흉선 조직내 세포수가 현저히 감소되었고 흉선이 흉선이 퇴축되는 현상을 보고한 바 있다. 그러나, 이들 호르몬이 흉선 세포에 어떠한 영향을 주어 퇴축되는지 그 작용에 있어서는 언급한 바 없다.

포유동물에서 GCS가 생체 및 시험관내 흉선 세포에 미치는 영향은 매우 심각하여 apoptosis를 유발하는 것으로 최근에 보고되었다 (Compton et al. 1988 ; Ojeda et al. 1990 ; 장 1992). Apoptosis는 살아 있는 생물체의 조직으로부터 세포가 사라지는 현상인데, 이는 여러가지 스트레스 인자에 의해서 세포내 endonuclease가 활성화 되어 DNA가 180-200 염기쌍으로 다양하게 절편화 되면서

chromatin이 응축되어 주위의 탐식 세포나 상피 세포에 의해 처리된다 (Davall and Wyllie 1986). 나일 틸라피아의 흉선에 있어서도 GCS가 apoptosis를 유발하는지 알아보려고, 1×10^7 cells/ml에 10^{-6} M의 농도로 12 시간 처리한 후에 DNA 전기 영동을 한 결과 Fig. 5에서와 같이 DNA가 180-200 염기쌍으로 다양하게 절편화 됨을 확인할 수 있었다.

수생 환경에는 여러가지 스트레스 인자가 존재하는데 그 중 갑작스런 온도의 변화에 따른 어류 및 양서류의 생리 및 면역학적 영향은 최근에 많은 연구자들에 의해서 조사되었으며, 이들의 결과는 체내 cortisol level의 증가를 초래하여 항원을 인지하는 림프구의 수적 및 기능적 감소와 탐식 세포의 탐식 능력 저하를 유발하는 것으로 알려졌다. Flory와 Bayne (1991)은 무지개송어의 백혈구를 대상으로 부신피질 호르몬의 일종인 epinephrine을 10^{-6} M과 10^{-5} M을 처리하여 탐식 세포의 chemiluminescence 반응을 조사한 결과 그 반응이 현저히 감소됨을 확인하였고, Ghoneum 등 (1988)은 틸라피아를 물리적 스트레스를 받게하여 자연 살해 세포의 활성 능력을 조사한 결과 중요하게 억제되는 것을 보고하였다. 또한 Houghton과 Matthews (1990)는 잉어 치어에 corticosteroid 호르몬을 투여하여 림프구의 항체 생산 능력을 조사한 결과 항원 (*Ichthyophthirius multifiliis*)에 대한 반응이 크게 억제 되었으며, 이 질병원에 쉽게 노출되어 결국 폐사에 이른다고 보고한 바 있다.

한편 생체내 cortisol level의 증가에 따른 말초 혈액내 백혈구의 수적 변화를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 10 mM의 GCS를 나일 틸라피아 복강에 주사하여 시간에 따른 말초 혈액내 백혈구의 수를 조사하였다. Table 1에서와 같이 과립 백혈구의 수적 변화는 없었지만, 림프구에 있어서는 호르몬 처리 시간에 따라 그 수가 현저히 감소되었다. 이 결과는 양서류, 조류 뿐만 아니라 넙치류에서 조사된 결과와 매우 유사하였다 (Garrido et al. 1989 ; Trout et al. 1988 ; Davison et al. 1988 ; Saad 1988).

이상의 결과를 종합해 볼 때 나일틸라피아의 흉선에 GCS는 무게와 세포수에 있어서 심각하게 영향을 미쳤으며, 결국 흉선 세포 apoptosis를 유발시키는 것으로 확인되었다. 그러나 포유동물에서와 같은 기전으로 apoptosis되는지에 대해서는 실험관내 수준에서 calcium, protein kinase C 및 cyclic adenosine monophosphate와 같은 세포내 2차 신호 전달자들의 역할을 더 조사해 보아야 할 것으로 사료된다. 말초 혈액내 림프구의 수적변화가 현저한 만큼 혈액내 림프구를 분리한 후 실험관내에서 이들 세포의 기능적 측면에서 보다 상세히 다루어야 될 것으로 사료된다.

요 약

나일 틸라피아의 흉선과 말초 혈액내 림프구에 glucocorticosteroid (GCS)가 미치는 영향을 알아보기 위해 여러가지 농도로 dexamethasone (DEX)와 hydrocortisone (HC)을 치어 (5-7 g) 복강에 주사하여 흉선의 조직과 세포수 등을 대조군과 비교하였다. 생체에 DEX와 HC를 투여한 군에서는 흉선의 무게 감소와 흉선 세포의 수적 감소가 나타났으며, 그 효과는 이들 호르몬의 처리 양과 시간에 의존적이었다. 10 mM DEX와 10 mM HC를 실험관내 흉선 세포에 12 시간 처리할 경우 DNA 절편화가 유도 되었으며, 그 유형은 180-200 염기쌍으로 다양하게 절편되었다. DEX와 HC를 생체에 여러시간 동안 처리했을 때 말초 혈액내 과립 백혈구의 수적 변동은 없었지만, 10 mM DEX와 10 mM HC를 2-3 일 처리시 말초 혈액내 림프구 수는 감소되었다.

이상의 결과는 흉선 세포와 순환하는 림프구가 호르몬의 특성과 처리량 및 시간과 같은 여러가지 요인에 따라 GCS에 반응하는 것을 시사해 주었다.

사 사

본 실험을 하는데 있어서 기초 시약 및 많은 조언을 해주신 박수일 교수님과 조직 표본을 제작하는데 있어서 도움을 주신 이택열 교수님께 심심한 사의를 표하는 바입니다.

참 고 문 헌

- Compton, M. M., J. S. Haskill and J. A. Cidlowski. 1988. Analysis of glucocorticoid actions on rat thymocyte deoxyribonucleic acid by fluorescence-activated flow cytometry. *Endocrinology* 122 : 2158~2164.
- Davall, E. and A. H. Wyllie. 1986. Death and the cell. *Immunol. Today* 7 : 115~119.
- Davis, K. B. and N. C. Parker. 1990. Physiological stress in striped bass : effect of acclimation temperature. *Aquaculture* 91 : 349~358.
- Davison, T. F., B. H. Misson, R. A. Williamson and J. Rea. 1988. Effect of increased circulating corticosterone in the immature flow on the blastogenic responses of peripheral blood lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 12 : 131~144.
- Ellis, A. E. 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leukocyte reactivity. pp 225~231. In : *Developmental Immunobiology* (Solomon, J. B. and J. D. Horton. eds).
- Flory, C. M. and C. J. Bayne. 1991. The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic response of leukocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* 15 : 135~142.
- Garrido, E., R. P. Gomariz, J. Leceta and A. Zapata. 1987. Effects of dexamethasone on the lymphoid organs of *Rana perezi*. *Dev. Comp. Immunol.* 11 : 375~384.
- Garrido, E., R. P. Gomariz, J. Leceta and A. Zapata. 1989. Different sensitivity to the dexamethasone treatment of the lymphoid organs of *Rana perezi* in two different seasons. *Dev. Comp. Immunol.* 13 : 57~64.
- Ghoneum, M. H., N. Egami, K. Ijiri and E. L. Cooper. 1986. Effect of corticosteroids on the thymus of the fish *Oryzias latipes*. *Dev. Comp. Immunol.* 10 : 35~44.
- Ghoneum, M. H., M. Faisal, G. Peters, I. I. Ahmed and E. L. Cooper. 1988. Suppression of natural cytotoxic cell activity by social aggressiveness in tilapia. *Dev. Comp. Immunol.* 12 : 595~602.
- Grace, M. F. and M. J. Manning. 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Dev. Comp. Immunol.* 4 : 255~264.
- Houghton, G. and R. A. Matthews. 1990. Immunosuppression in juvenile carp *Cyprinus carpio* L. : the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21-hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. *J. Fish Dis.* 13 : 269~280.

- Ojeda, F., M. I. Guarda, C. Maldonado and H. Folch. 1990. Protein kinase C involvement in thymocyte apoptosis induced by hydrocortisone. *Cell. Immunol.* 125 : 535~539.
- Ortize-Muniz, G. and M. Sigel. 1971. Antibody synthesis in lymphoid organs of two marine teleosts. *J. Peticulo-endoth. Sco.* 9 : 42~52.
- Park, M. S. 1990. DNA isolation salt extraction. UCLA Tissue Typing Laboratory. 5/90.
- Pickering, A. D. 1992. Rainbow trout husbandry : management of the stress response. *Aquaculture* 100 : 125~139.
- Saad, A. H. 1988. Corticosteroids and immune systems of non-mammalian vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 12 : 481~494.
- Sacombe, C. J., J. J. M. Van Groningen, W. B. Van Muiswinkel and E. Egberts. 1983. Ontogeny of the immune system in carp (*Cyprinus carpio* L.). The appearance of antigenic determinants on lymphoid cell detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 7 : 455~464.
- Tatner, M. F. 1982. The morphology of the trout, *Salmo gairdneri* Richardson, thymus : some practical and theoretical considerations *J. Fish. Biol.* 21 : 27~32.
- Tatner, M. F. and M. J. Manning. 1985. The ontogenetic development of the reticuloendothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, *J. Fish. Dis.* 8 : 35~41.
- Trout, J. M., M. M. Mashaly and H. S. Siegel. 1988. Changes in the profiles of circulating white blood cells, corticosterone, T₃ and T₄ during the initiating of humoral immunity in immature male chickens.
- Warr, G. W., D. De Luca, J. M. Decker, J. J. Marchalonis and L. N. Ruben. 1977 Lymphoid heterogeneity in teleost fish : Studies on the genus *Carassius*. pp 241~248. In : Solomon, J. B. and J. D. Horton, eds. *Developmental Immunobiology*.
- 장선일, 1992, 마우스 흉선세포의 Apoptosis 조절기전, 박사학위 논문, 전북대학교, pp 1~104.