

In vitro에서 cortisol 투여에 의한 LPS 전처치 고양이 림프구의 IgG 생산변화

나 기 정
충북대학교 수의과대학

In vitro Change of IgG Production by Administration of Cortisol in Lipopolysaccharide Treated Lymphocyte of Cat

Ki-jeong Na

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Republic of Korea

ABSTRACT : Change of IgG production of feline mononuclear cell(MNC) was evaluated in vitro. MNC was treated with lipopolysaccharide(LPS) before cortisol administration. Cortisol induced change of B cell subpopulation with surface IgG and reduced IgG production against virus. However, before treatment of MNC with LPS induced increase of B cell subpopulation with surface IgG and IgG production against virus. These results imply that diminution of IgG production by cortisol is well again by LPS treatment.

Key words : cortisol, cat, mononuclear cell, IgG

서 론

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람음성균인 *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Neisseria meningitidis* 등에 존재한다. 이것은 탐식세포에 의해 IL-1과 TNF- α 를 생성하도록 하여 혈압저하, 발열, 설사 등을 일으키게 한다⁸. 그러나, 사람에서 cortisol은 LPS에 의한 영향을 감소시키며 mitogen에 의한 cytokine의 분비를 저하시킨다³. LPS는 T세포 의존성 항원으로써 탐식세포에 의해 IL-6의 생성도 유도하며 B세포에 대한 강력한 mitogen으로 알려져 있다^{8,12}.

한편, 글루코코르티코이드들은 natural killer 세포의 활성을 저하시키고¹⁰, IL-2 생산을 저하시키며 림프구의 분화도 억제시키는 것으로 밝혀졌다⁵. 단핵구에 있어서 TNF- α 와 IL-1 β 의 생성이 dexamethasone에 의해 mRNA 수준에서 억제되며², cortisol에 의해서 단핵구의 세포분열도 억제된다⁴. Cytokine중 IL-6는 T세포와 항원제시 세포인 탐식세포 및 단핵구와의 상호작용하여 B세포를 자극하여 항체의 생산과 분열을 촉진시킨다⁷. 그리고 cortisol은 IL-6의 생산을 억제시키며 단

핵구가 IL-1 β 를 생성하는 것을 억제한다². 또다른 연구에서는 dexamethasone을 주사했을 때 휴지기 상태의 B세포는 표면항원을 발현하는 mRNA가 50% 이상 억제되었고 활성화된 B세포는 이보다 훨씬 적게 억제되는 것이 밝혀졌다¹¹.

이러한 관찰들은 LPS로 단핵구를 미리 활성화시켜서 cytokine의 분비를 촉진시키고 B세포를 자극하면 높은 cortisol 농도에서도 면역글로불린의 생산이 이루어질 수 있다는 가정을 가능하게 해 준다. 따라서 in vitro에서 LPS로 전 처치한 고양이 말초 혈액 MNC에서 cortisol에 대한 B세포의 IgG 생산을 검토하기 위하여 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

MNC의 분리와 배양

임상병리검사 및 신체검사 결과 건강한 것으로 판정된 2년생의 고양이에 feline infectious peritonitis (FIP) vaccine (modified live, Mallinckrodt Veterinary, Japan)을 접종하고 1주일 후에 15 ml를 채혈하여 heparin 처리하였다. 채혈한 혈액은 1,500×g로 10분간 원심하여 buffy coat를 채취하였다. 이것을 3 ml의 PBS와 섞어서 비중 1.077의 Lymphoprep(Nycomed,

¹Corresponding author.

Table 1. Treatment of mononuclear cells

Group	LPS ¹ (ng/ml)	Cortisol ² (ng/ml)	FIP vac. sol. ² (μl/ml)
I	100	0	15
II	100	400	15
III	0	400	15
IV	0	0	15
V	0	0	0

1: Added on day 0.

2: Added on day 2.

Norway)가 3 ml 들어 있는 시험관에 천천히 중층하여 실온에서 400×g로 30분간 원심분리 하였다. PBS, MNC, Lymphoprep, 적혈구와 과립구의 순서로 층이 분리된 후에 MNC층을 채취하여 5 ml의 PBS에 넣어 희석한 후 400×g로 10분간 원심분리하고 상층액을 버렸다. 적혈구가 많이 포함된 경우에는 0.83% NH₄Cl-Tris-base로 적혈구를 용혈시켰다. 세척을 3회 실시한 후에 MNC를 PBS로 총량이 10 ml로 되게 하여 혈구계산판으로 숫자를 세었다. 배양액은 RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., USA)에 fetal bovine serum(FBS, 10%; Gibco BRL, Life Technologies, Inc., USA)과 10 μg/ml의 gentamicin이 들어 있는 것을 사용하였다. 생존성 검사는 0.4%의 trypan blue로 염색한 후 현미경 하에서 하였고, 이때의 MNC 생존율은 98% 이상이었다. 세포는 2×10⁶개/ml로 하여 24 well의 세포 배양용 plate(Nunc Co., Denmark)에 well당 1 ml씩을 넣어 5% CO₂가 들어 있고 가습된 37°C의 항온기에서 배양하였다.

MNC를 배양하면서 Table 1과 같이 군별로 처치를 하였다. LPS(phenol extracted preparation from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma Chemical Co., USA)는 배양과 동시에 첨가하였으며, 배양 24시간 후에 cortisol 및 FIP vaccine 용액을 각각 첨가하였다.

Flow cytometry를 이용한 B세포의 표면 IgG 비교

B세포 표면에 IgG를 가지고 있는 세포의 수를 군간 비교하기 위해서 배양 3일째의 세포를 회수하여 일차 buffer로 3회 세척하였다. 이것에 일차 buffer를 얼음 위에서 넣고 1시간 배양하였다. 32배 희석한 anti-cat IgG fluorescein isothiocyanate conjugate goat IgG를 50 μl 넣고 세포부유액과 일차 buffer를 각각 50 μl씩 넣어 얼음 위에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4°C에서 400×g로 3분간 원심하여 상층액을 제거하고 이차 buffer를 넣어 세척하는 방법을 3회 반복하였다. 이때 사용한 일차 buffer는 PBS에 1 mM의 sodium a-

zide, 1%의 bovine albumin, 그리고 250 mM의 EDTA가 함유된 것이었으며, 이차 buffer는 일차 buffer에서 bovine albumin이 제거된 것이었다. 이 이후에는 2% formaldehyde 200 μl로 부유시켰다. 반응이 모두 끝난 것은 flow cytometry system(FACS Calibur-S system, Becton Dickinson, USA)를 이용하여 1×10⁴개의 세포에 대한 형광강도를 측정하여 군별 비교하였다. FACS에서 B세포의 분포영역 설정은 IgG에 대한 항체를 이용하여 형광항체염색을 실시한 시료를 검사하여 이들이 분포하는 부분을 추적하여 결정했다.

배양 상층액 중의 FIP virus에 대한 IgG 비교

배양 8일째의 배양 상층액을 채취하여 FIP virus에 대한 IgG의 생산력을 군별로 비교하였다. 검사는 crandel feline kidney cell(CrFK)에서 TN-406 virus strain을 배양하여 FIP에 대한 검사용 kit로 제작된 슬라이드(VMRD, Inc, USA)를 사용하였다. 슬라이드에 50 μl의 상층액을 올리고 37°C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 pH 9.0의 세척용 buffer로 세척하고 10분간 담겼다. 세척 후에는 형광항체를 50 μl 넣고 37°C 배양기에서 30분간 반응시켰다. 형광항체의 반응이 끝난 다음 세척용 buffer로 세척을 하였다. Mounting 용액으로 mounting하고 confocal imaging system(MRC-1024, Bio-Rad, USA)을 이용하여 비교하였다.

통계

무처치군과 처치군간의 비교는 통계용 패키지인 SAS의 GLM test로 분산분석을 실시하였다.

결 과

Flow cytometry를 이용한 B세포의 표면 IgG 비교

FACS에서 autofluorescence의 기준은 형광항체염색을 하지 않은 무처치 대조군의 시료를 가지고 1×10⁴개의 세포에서 형광을 측정했을 때 형광을 띠는 세포의 수를 0.5% 미만이 되도록 하였다.

RPMI 1640의 배양액만으로 배양한 대조군에 있어서는 전체 B세포 중에 표면에 IgG를 띠고 있는 것은 7.3%로 나타났다. 가장 높은 수치를 나타낸 것은 LPS를 전처치하고 FIP vaccine을 첨가한 군으로 전체 B세포 중에 9.2%를 차지하였다. Cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군에서는 대조군에 비해서 0.3%가 적었다. LPS를 전처치하고 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군에서는 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군보다 1.3% 증가되었다(Fig 1).

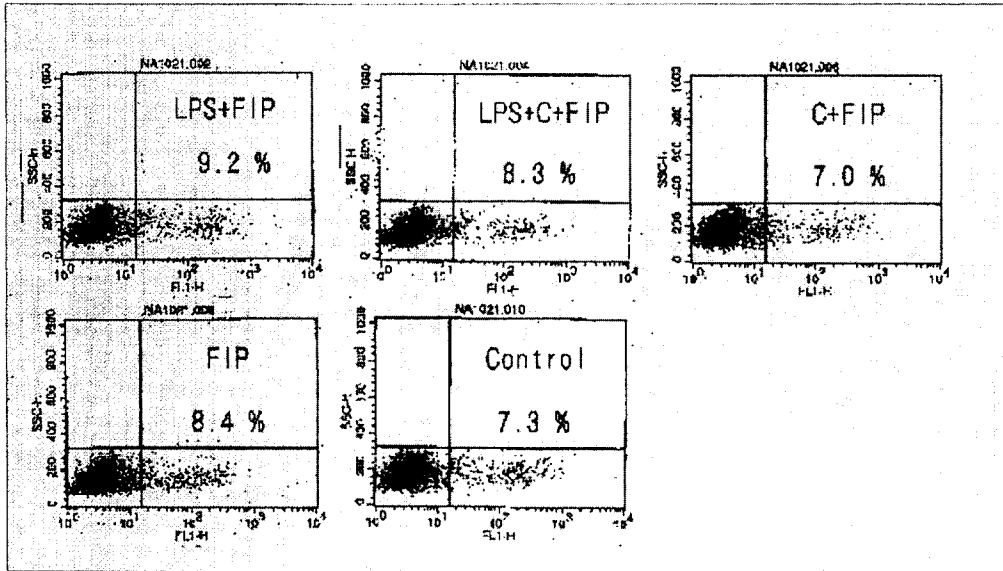


Fig 1. Change of B cell subpopulation with surface IgG. Percentage indicate B cell population with sIgG to the total B cell counts, respectively.

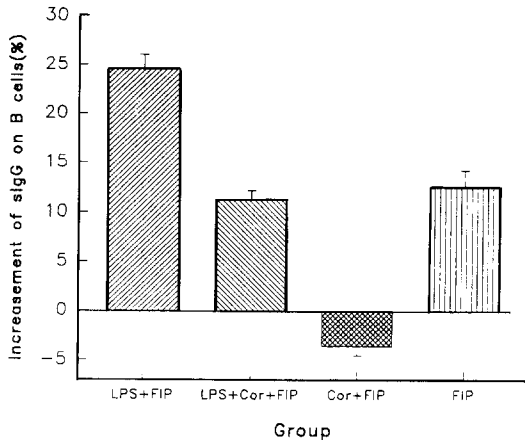


Fig 2. Flow cytometry analysis of surface IgG expression in B cells. Samples were obtained on third day after treatment. B cells were stained with anti-cat IgG goat IgG FITC conjugate.

무처치 대조군의 B세포 표면에 IgG를 나타내고 있는 세포수를 0%로 잡고 이것과 비교하여 다른 군의 형광을 나타내는 B세포 수의 상대적인 증감을 %로 Fig 2와 같이 나타내었다. LPS를 전처치한 경우는 대조군에 비하여 B세포 표면에 IgG를 나타내고 있는 세포수가 25% 증가하였으며 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 경우는 5%가 감소하였다. LPS를 전처치하고

cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군의 B세포 표면에 IgG를 나타내고 있는 세포수는 FIP vaccine만을 첨가한 것과 비교했을 때 차이가 없었으나 대조군에 비하여 10% 이상이 증가되었다(Fig 2).

배양 상층액 중의 FIP virus에 대한 IgG 비교

FIP virus에 대한 IgG의 검사용 kit의 검정과 측정 시료의 대조를 위해서 배양액 대신 FIP virus에 대한 항체 양성 대조혈청과 음성 대조혈청을 사용하였다. 배양 8일째의 상층액 중의 FIP virus에 대한 IgG의 생성은 Fig 3과 같이 나타났다. LPS로 전처치하고 FIP vaccine을 첨가한 것은 무처치 대조군 뿐만 아니라 다른 처치군에 비해서도 높은 형광을 나타내는 것을 알 수 있다. LPS로 전처치하고 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 경우는 LPS로 전처치하지 않고 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군보다 높은 형광을 나타내는 것을 알 수 있다.

고 찰

이 실험에서는 mitogen이나 기타 면역증강제에 의하여 활성화된 MNC들이 높은 cortisol 농도에서도 체액성 면역을 효과적으로 형성하는지 알아보고자 *in vitro* 실험을 실시하였다. Pokeweed mitogen 및 LPS는 단핵구를 자극하여 IL-1과 IL-6를 분비하도록 한다. IL-1은

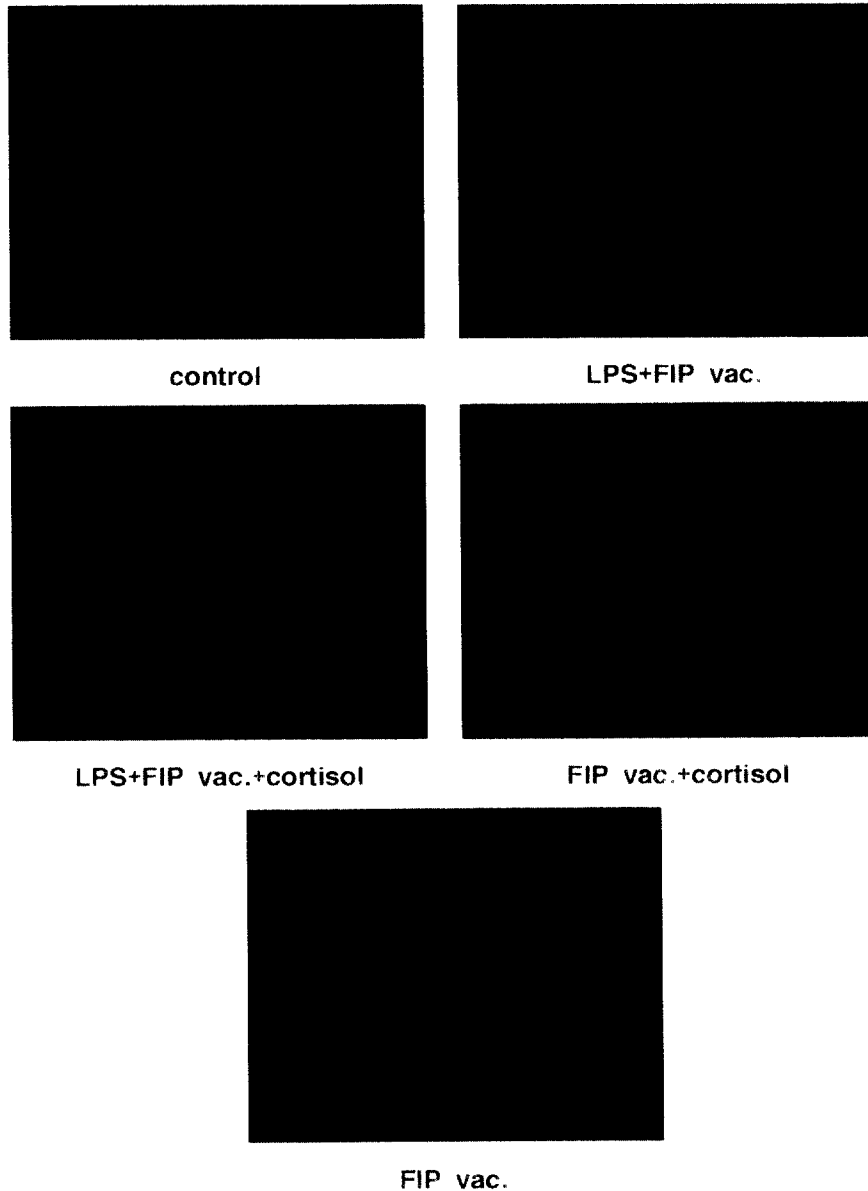


Fig 3. Detection of cat IgG to FIP virus with indirect immunofluorescence assay. Samples were supernatants of incubated cells.

염증반응의 초기 단계를 시작하도록 할뿐만 아니라 IL-6은 B세포의 분열을 촉진시킨다⁷. 그러므로, 체액성 면역에서 B세포만을 자극하는 것보다 단핵구를 자극하여 체액성 면역을 활성화시키는 것이 효과적인 것으로 생각되어 LPS를 mitogen으로 사용하였다. 일반적으로 LPS를 포함한 mitogen의 MNC에 대한 효과는 24~48시간에 최대의 효과를 나타낸다⁶. 본 실험에서는

LPS의 효과를 최대로 이용할 수 있고 항원에 대한 MNC의 반응 시간을 *in vitro*에서 최대한 확보할 수 있도록 하기 위하여 LPS를 첨가하고 24시간 반응한 후에 FIP와 cortisol을 첨가하였다.

체액성 면역을 형성하는 면역글로불린에는 여러 가지 종류가 있다. 이 중에서 혈액중의 70% 이상을 차지하는 면역글로불린이 IgG이다⁶. 그리고 사람의 면역

글로불린의 반감기는 IgD가 3일 정도이고 IgM이 10일인 반면 IgG는 약 20일로 알려져 있다¹². 고양이에서의 면역글로불린의 반감기에 대한 자료는 찾아볼 수 없었으나 사람에서와 유사한 기간에 해당하는 반감기를 가질 것으로 추측된다. 이에 따라 본 연구에서는 체액성 면역의 중요한 역할을 수행하는 IgG에 대해 알아보기 위해 실험을 실시하였다. MNC를 오랫동안 배양하기 어려운 점 때문에 1주일 전에 FIP vaccine을 미리 접종하여 배양 3일째에는 FIP vaccine에 대한 IgG가 일정수준이 유도되도록 하였다.

B세포 표면의 면역글로불린에 대한 분석방법에 대해서 몇 가지 문제점과 해결 방법들이 여러 연구자들에 의해서 제시되어 있다. IgG를 검출하기 위한 항체는 IgG의 F(ab')에 대한 것을 사용하는 것이 IgG 전체에 대한 항체를 사용하는 것보다 정확도가 높았다¹³. 반응 온도에 따라서도 다양한 결과를 나타냈고, 사람에서 림프구의 표면 Ig를 검출할 때 동일한 시료에서 온도에 따른 변화가 있었다⁹. 37°C와 4°C 중에 후자가 훨씬 높은 면역글로불린 검출률을 나타냈다. 본 실험에서는 항체반응을 얼음위에서 실시하였으며 FITC가 표지된 항체는 고양이 IgG 전체에 대한 염소 IgG였다. 보다 정확한 표면 IgG의 검출을 위해서는 F(ab')에 대한 항체를 사용하는 것이 효과적일 수 있으나 각각의 처치에 대한 변화 정도를 비교하는 이 실험에서는 별다른 문제가 되지 않았다. 그러나 결과는 제시되지 않았지만 배양일이 늘어남에 따라 MNC의 생존율이 저하되고 면역형광염색의 결과가 일정하지 않게 나왔다. 이것은 Winchester 등¹³이 지적하였듯이 세포가 손상을 받으면서 이것에 항체가 결합하여 면역복합체가 형성되고 여기에 FITC가 염색되는 것으로 판단된다.

배양 3일째 회수하여 형광항체염색을 한 후에 confocal microscope로 확인한 결과 FITC에 염색이 된 것과 염색이 되지 않은 MNC를 구분할 수 있었다. 배양한 MNC의 표면 IgG에 대한 염색 결과 LPS의 전처치는 IgG를 발현하는 B세포의 숫자를 증가시킴을 알 수 있었다. LPS는 T 세포 비의존성 항원으로 탐식세포를 자극하여 cytokine을 분비하게 하고 B세포를 직접 자극하여 분열하게 한다¹. 이러한 작용으로 인해 LPS의 전처치는 표면에 IgG를 발현하는 B세포의 숫자를 증가시킨 것으로 보인다. 이때의 증가율은 대조군과 비교하여 24%가 증가하였다. 이것은 FIP vaccine만을 첨가한 군과 비교했을 때는 2배의 증가율을 보인 것이고, LPS를 전처치하지 않고 cortisol과 FIP vaccine을 첨가한 군과 비교했을 때는 8배의 증가율을 보인 것이다. 고양이가 스트레스를 받았을 때의 혈중 농도에 해

당하는 400 ng/ml의 cortisol 농도에서 IgG를 발현하는 B세포의 숫자가 대조군에 비하여 감소됨을 알 수 있었다. LPS를 전처치하였을 경우는 cortisol의 존재하에서도 B세포의 표면에 IgG의 발현율을 상당히 높였다. 대조군에 비해서는 11%가 증가하였고 cortisol을 첨가한 군과 비교했을 때는 약 14%가 증가하였다. 이것은 dexamethasone에 의하여 B세포의 MHC class II의 발현에 관여하는 mRNA가 활성화된 상태에서는 휴지기 상태에서 보다 훨씬 덜 억제된다는 McMillan 등¹⁴의 결과와 유사한 것이다.

이 실험 방법에서는 FIP virus에 대한 IgG의 생산량을 정량할 수는 없었지만 각각의 군에 대한 IgG 생성 정도를 비교할 수 있었다. 배양 8일째의 상층액을 면역염색을 통해 군별 차이를 비교하였다. LPS를 전처치하고 FIP vaccine을 첨가한 경우 가장 높은 형광을 나타냈고, cortisol과 FIP vaccine만을 첨가한 경우는 음성의 대조군과 비교했을 때 차이가 없었다. 이것은 cortisol이 virus의 감염에 대응하는 IgG의 생산을 감소시키는 것으로 판단된다. 또한, LPS는 IgG의 생성을 촉진시킴도 알 수 있다. 그리고 cortisol의 존재하에서도 LPS 전처치는 단핵구의 IL-6 생산을 유도하여 B세포의 분화를 촉진시킴으로써 IgG의 생산을 증가시키는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 LPS 전처치는 표면에 IgG를 발현하는 B세포의 숫자와 virus에 대한 IgG의 생성을 증가시키는 것을 알 수 있다. 그리고, 강력한 스트레스 상태에 해당하는 높은 cortisol 농도에서도 LPS로 전처치를 하여 cytokine의 분비 등 MNC를 미리 활성화시킨 경우에는 효과적인 IgG의 생성을 유도할 수 있음을 알 수 있다.

결 론

고양이 말초혈액의 MNC를 *in vitro*에서 LPS로 전처치하였을 때 cortisol의 유무에 따른 B세포의 IgG 생산을 검토하였다. B세포 표면의 IgG 생성과 FIP virus에 대한 IgG의 생산을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Cortisol은 표면에 IgG를 가지고 있는 B세포의 수를 감소시키며, virus에 대한 IgG의 생산을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. MNC의 LPS 전처치는 표면에 IgG를 가지고 있는 B세포의 수를 증가시켰고, virus에 대한 IgG의 생산도 증가시켰다. 그리고 MNC의 LPS 전처치는 400 ng/ml의 cortisol 농도에서도 표면에 IgG를 가지고 있는 B세포의 수와 virus에 대한 IgG의 생

산을 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 cortisol에 의한 IgG 생산 감소는 MNC의 LPS 전처치로 회복시킬 수 있음을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Co. 1994: 240-260.
2. Amano Y, Lee SW, Allison AC. Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: Mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol* 1993; 43(2): 176-182.
3. Barber AE, Coyle SM, Marano MA, Fischer E, Calvano SE, Fong Y, Moldawer LL, Lowry SF. Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J Immunol* 1993; 150(5): 1999-2006.
4. Baybutt HN, Holsboer F. Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology* 1990; 127(1): 476-80.
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. Gershwin LJ, Krakowka S, Olsen RG. Immunology and immunopathology of domestic animals. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc. 1995: 30-39, 99-110.
7. Hirano T. Interleukin-6. In: Thomson A. The cytokine handbook. 2nd ed. USA: Academic Press 1994: 145-168.
8. Kuby J. Immunology. 2nd ed. USA: W. H. Freeman and Co. 1994: 300-321.
9. Lobo PI, Westervelt FB, Horwitz DA. Identification of two population of immunoglobulin-bearing lymphocytes in man. *J Immunol* 1975; 114(1): 116-119.
10. McGlone JJ, Lumpkin EA, Norman RL. Adrenocorticotropin stimulates natural killer cell activity. *Endocrinology* 129(3): 1653-8, 1991.
11. McMillan VM, Dennis GJ, Glimcher LH, Finkelman FD, Mond JJ. Corticosteroid induction of Ig super(+) Ia super(-) B cells *in vitro* is mediated via interaction with the glucocorticoid cytoplasmic receptor. *J Immunol* 1988; 140(8): 2549-2555.
12. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. 3rd ed. London, UK: Mosby-Year Book Europe Ltd. 1993: 7.1-7.16.
13. Winchester RJ, Fu SM, Hoffman T, Kunkel HG. IgG on lymphocyte surfaces; Technical problems and the significance of a third cell population. *J Immunol* 1975; 114(4): 1210-1212.