

Prednisolone의 투여에 의한 마우스 비장의 Lymphocyte Subset의 변화

이경리 · 이병한 · 김진영 · 임좌진 · 정병현¹
건국대학교 축산대학 수의학부

The Effect on the Changes of Lymphocyte Subset in Spleen of Mouse by Prednisolone Administration

Kyung-lee Lee, Byeong-han Lee, Jin-young Kim, Joa-jin Lim and Byung-hyun Chung¹
School of Veterinary Medicine, Konkuk University Department of Laboratory Animal Research

ABSTRACT : Corticosteroids have long been used for anti-inflammatory, anti-rheumatoid and other purposes in hospital. These effects may be due to inhibit immune reaction. So the animal given corticosteroids was more susceptible to infection because of immunosuppressive effect of corticosteroids. The purpose of this study was to investigate the effects of prednisolone on the lymphocyte subset in the spleen, immunoglobulin in serum, spleen weight, thymus weight and total WBC in peripheral blood. Mice were randomized into 3 groups. Each group has 24 mice. The small dosage group were given by 4 mg/kg/day of prednisolone for 4 days and the large dosage group were given by 8 mg/kg/day respectively. Prednisolone was suspended in saline and orally administered. Mice in control group were given saline alone. Eight mice in each group were sacrificed every week after administration of prednisolone. The weight of thymus and spleen were measured immediately. Lymphocytes were taken from spleen and these cells were analysed by flow cytometry. Also the concentration of total immunoglobulins in serum were assayed by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). T cell, T-helper cell and T-cytotoxic cell were all significantly ($P<0.05$) decreased at 1 week after administration of prednisolone and at 2 weeks they recovered similarly to that of control. Population of B cell showed various distribution. The concentration of total immunoglobulins in serum was not changed significantly. The weight ratio of spleen to body decreased significantly ($P<0.05$) during prednisolone administration but increased at 1 week later. Eventually the weight ratio was recovered to that of control at 2 weeks. The weight ratio of thymus to body decreased significantly ($P<0.05$) by prednisolone and recovered gradually up to normal ratio 2 weeks later.

Key words : corticosteroid, cellular immunity, spleen, lymphocyte, mice.

서 론

Corticosteroids는 부신피질에서 분비되는 호르몬으로 당과 단백질 대사 등에 관여하는 glucocorticoids와 무기질 대사에 관여하는 mineralocorticoids로 분류된다. 이중 glucocorticoids는 보다 광범위한 작용을 하며 일부 mineralocorticoids 작용을 한다²¹. Glucocorticoids는 성장과 저장성의 신체리듬을 생리적 활성화와 열량 소모의 방향으로 전환시키는 작용으로, 간에서의 당신생을 증가시키고²⁴, 식욕 중추를 자극하며¹¹, 성장

호르몬의 분비를 억제하고³³, 성호르몬의 분비도 감소시킨다²². Corticosteroids는 면역계에도 영향을 미치는데³⁷, lymphokine과 같은 면역계의 매개체와 prostaglandins, leukotriens, kinins, serotonin, histamine 등의 염증반응의 매개체를 음성 feed-back system으로 조절하며²⁸, 염증 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다¹.

Prednisolone, prednisone, dexamethasone 및 betametasone 등의 합성 glucocorticoid는 염증, 알레르기, 면역 반응에 대한 억제인자로^{9,16,23,36}, shock에 대한 치료제²⁴로 인의 및 수의 임상에 널리 사용되고 있다^{7,29}.

근래에는 corticosteroids의 면역반응을 억제하는 작용을 이용해 조직·장기 이식 후에 나타나는 거부반

¹Corresponding author.

응을 억제하는 목적으로도 사용이 증가하고 있으나³⁶, 이에 따른 부작용과 의원성 질환에 대한 연구도 꾸준히 있어 왔다. Simmons 등(1978)³⁹은 장기이식 이후에 면역억제제를 투여받은 환자에서의 CMV(cytomegalovirus)의 감염이 무증상의 viremia에서부터 심각한 증상, 사망에까지 이르는 다양한 정도의 질병을 일으킬 수 있다고 하였으며, MIST(maintenance immunosuppressive treatment)목적으로 장기간 치료를 받는 사람들에게서 특히 lymphoid cell과 관련한 악성 질환으로 발전할 위험이 증가하는 것으로 알려져 있다^{8,31,32}. Lymphopenia는 corticosteroids에 의한 면역억제 작용의 중요한 결과로 여겨지기 때문에¹⁵ lymphocyte의 수를 측정하고 그 subclass를 분석하는 것은 면역억제 상태를 파악하는 한 방법이 될 수 있으며, Tornatore 등(1995)⁴⁴은 신장이식수술 후 methylprednisolone을 장기적으로 투여받고 있는 환자에서 전반적인 lymphopenia와 T-helper cell의 감소가 있음을 보고하는 등 corticosteroids를 장기간 적용함으로써 면역기계에 억제작용이 일어난다고 하였다.

Lymphocyte의 표면에는 여러 가지 당단백질이 드러나 있는데 lymphocyte의 기원과 분화된 정도, 기능에 따라 그 종류가 다르다. CD4, CD8, CD3, B220은 T cell과 B cell표면의 당단백질 가운데 하나로서 T-helper cell과 T-cytotoxic cell은 CD4+/CD8-와 CD4-/CD8+로, T cell과 B cell은 각각 CD3+/B220-와 CD3-/B220+로 구분할 수 있다. 이런 특성을 이용하여 이들 당단백질에 형광으로 표시된 단클론항체를 붙여 flow cytometry를 이용하여 lymphocyte의 subset을 정량·분류하는 방법은 빠르고 정확한 방법으로서 30 세포성 면역의 상태를 관찰·연구하는데 많이 이용되고 있다.

Corticosteroids는 동물의 종류에 따라 그 영향력이 달라서 치료 목적에 따른 투여용량은 동물과 적용되는 상태와 문헌에 따라 다양하게 제시되어 있다. 소, 말, 돼지 등 발굽이 있는 중·대형 가축에서는 항염증 목적으로 1~2 mg/kg³⁵이 제시되어있고, 개와 고양이에 대해서는 질병과 상황에 따라 더욱 세분화되어 있다. Corticosteroids는 항염증, 항류마티스, 자가면역 반응 억제 등의 다양한 목적으로 사용되는 약물이지만 그 효과와 부작용에 대해서는 아직도 다 밝혀져 있지 않고 있으며 그 적용기간과 용량에 대한 문제는 계속 대두되고 있다. 그러나 대부분의 실험이 다량의 corticosteroids를 사용하거나, 장기간 투여받는 경우에 편중되어 있고, 투여 종료 이후의 회복기간에 따른 면역계의 변화를 관찰한 경우는 드물다.

본 실험은 수의 임상에서 널리 사용되는 prednisolone의 일반 항염증 목적으로 적용되는 용량인 4 mg/kg/day³⁵과 그 2배인 8 mg/kg/day을 4일 동안 mouse에 투여하여 투여가 종료된 후, 일정 기간에 따른 비장의 lymphocyte subset의 변화, 혈중 총 immunoglobulin, 흉선과 비장의 무게의 변화를 관찰하여 세포성 면역과 체액성 면역의 변화를 관찰하고 prednisolone을 투여하기 이전의 상태로 회복하는 기간을 확인하므로써 corticosteroids제제를 투여한 환축의 면역계의 변화를 예상하고 그 특성에 따른 적절한 조치를 취하여 보다 효과적이고 안전한 환축의 관리에 도움이 될 수 있도록 하여 수의 임상에 적용할 수 있게 하기 위하여 수행 하였다.

재료 및 방법

공시동물

실험동물은 평균체중 23.5±1.4 g의 5~7주령의 SPF 압컷 ICR Mice 80마리를 사용하였다. 사육환경은 23±2°C의 온도와 12시간의 명암주기를 유지하였으며, 물과 사료(쥐삼양 배합사료, Extrugen®, Mouse용)는 시료를 채취하기 이전의 절식시간(12시간)을 제외하고는 자유급식 시켰다.

실험방법

실험군은 우선 4 mg/kg/day(S군)와 8 mg/kg/day(L군)로, 투약 용량에 따라 2군(n=24)으로 나누었으며 대조군은 모두 24마리를 두었다. 각 군의 체중은 표준편차가 1 g 이내가 되도록 배치하였다(Table 1).

실험군에는 각각의 용량만큼의 prednisolone(1,4-pregnadiene-11β, 17α, 21-triol-3,20-dione.Powder SIGMA, U.S.A)을 생리식염수에 용해하여 1일 12시간 간격으로 oral zonde를 이용하여 경구투여하였다. 대조군에는 실험군과 동일한 방법으로 같은 용량의 생리식염

Table 1. Grouping of mice

Group	PDS dosage (mg/kg/day)	Time point of sampling after administration		
		0	1	2
S	4	8	8	8
L	8	8	8	8
C	0	8	8	8

PDS: Prednisolone, 0: the time point when administration ends, 1: 1 week after administration ends, 2: 2 weeks after administration ends.

수를 투여하였다.

시료채취

투여 용량에 따라 나뉘어진 실험군의 mice는 투약 종료 직후, 투약종료 1주 경과 후, 2주 경과 후에 각각 8마리로부터 시료를 채취하였으며, 대조군은 실험군의 실험일에 8마리로부터 시료를 채취하여 분석에 사용하였다.

시료는 mouse를 12시간 절식시킨 후, 0.2 ml/head의 thiopenton sodium(25 mg/ml)을 복강 내에 주사하여 마취시키고 개복하여 복대동맥에서 채혈을 하고 혈액은 EDTA가 첨가된 시험관에 0.5 ml를 넣고 나머지는 첨가물이 없는 시험관에 넣어 실온에서 약 20분 응고시켜 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

흉선과 비장은 적출하여 무게를 측정하여 기록하고, 비장은 petri dish에 분주해놓은 fetal calf serum(BIO WHITTAKER, U.S.A.)을 5%첨가한 RPMI Medium 1640(with L-glutamine without sodium bicarbonate, GIBCOBRL, U.S.A. Penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml: 5% · RPMI)에 담아 두었다가 전처리하여 flow cytometry 분석에 이용하였다.

Flow cytometry

마우스에서 적출하여 5% · RPMI 배지에 담가 놓은 비장에서 세포를 분리하고 얻어진 세포를 5%RPMI 배지 5 ml에 부유시키고 1,800 rpm에서 3분동안 원심 분리시킨다. 침전된 세포를 취하여 hemolytic buffer 5 ml에 부유해 5분간 방치하여 적혈구를 용혈시키고 다시 원심분리하여 상층액은 버리고 가라앉은 세포를 5% · RPMI 배지에 부유한 후 및 같은 조건으로 원심 분리 시켰다. 이렇게 3회 세척하여 hemolytic buffer를 제거하고 100 µm mesh에 통과시켜 백혈구를 분리하였다.

HBBS(Hanks balanced buffer solution without sodium bicarbonate, GIBCOBRL, U.S.A.)에 적정 비율로 monoclonal antibody(PharMingen, U.S.A.)를 희석한 후, CD4항체(Fluorescein Isothiocyanate(FITC) conjugated rat anti-mouse CD4 monoclonal antibody)와 CD8항체(R-Phycoerythrin(R-PE)-conjugated rat anti-mouse CD8a (Ly-2) monoclonal antibody)를 하나의 시험관(12×75 mm, round bottom tube)에 10 ml씩 넣고, CD3항체(FITC-conjugated hamster anti-mouse CD3e monoclonal antibody)와 B220항체(R-PE-conjugated rat anti-mouse CD45R/B220 monoclonal antibody)도 같은 방

식으로 하나의 시험관에 분주하여 각각 T-helper cell 과 T-cytotoxic cell, T cell과 B cell의 subset을 구할 수 있도록 하였다. 100 µm mesh를 통과시킨 cell suspension 50 µl(100만개)를 항체를 넣은 tube에 각각 넣고 항체와 반응하도록 부드럽게 흔들어 섞어준 후 ice bath에 40분 동안 정치시켰다. 40분 동안 반응시킨 후 염색되지 않은 cell과 남은 항체를 제거하여 비특이 반응을 없애기 위하여 tube에 RPMI 배지 2 ml을 넣어 세척(1800 rpm에서 3분 원심분리)하였다. 상층액은 제거하고 다시 RPMI 배지 1 ml에 cell을 희석해 같은 방법으로 2회 더 세척하고 flow cytometry에서 분석할 때까지 4 °C에 보관하였다. 하루 이상 보관해야 할 경우에는 0.5% paraformaldehyde에 고정하여 4 °C, 압소에 보관하였다⁴².

시료는 1회 분석에 10,000개의 세포를 counting하도록 설정하였다. 측정은 FACStar PLUS(Becton Dickinson)를 이용하였고, 분석에는 Becton Dickinson사의 Lysis-2 Program과 WinMiDi program를 이용하였다.

ELISA

혈청을 carbonate coating buffer와 1:9로 섞어 96 well flat bottom plate의 첫 번째 well에 100 µl씩 분주해 10진법으로 희석하고 마지막 줄은 blank로 설정하였다. Plate를 4 °C에서 over night시킨 후 3번 세척하고 Bovine serum albumin을 2% 첨가한 PBS (2% BSA · PBS)로 blocking한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.

Plate를 다시 3회 세척하고 conjugate로 anti mouse IgG를 2%BSA · PBS에 희석하여 100 µl씩 분주하여 다시 1시간 동안 incubation하였다. Plate를 마지막으로 3회 세척하고 horse reddish peroxidase(HRP) substrate solution(0.1 M Phosphatecitrate, O-Phenylenediamine, H₂O₂)을 분주하여 10분 동안 발색시킨 후 각 well에 3 M H₂SO₄ 50 µl씩 분주하여 발색을 정지시키고 즉시 ELISA reader(Microplate autoreader, BIO-TEK INST-RUMENT, EL311 SL)로 492 nm에서 OD가를 측정하였다⁴⁷.

Total WBC

EDTA tube에 분주한 혈액은 부드럽게 흔들어 준 후 바로 NIHON KOHDEN사의 Celltac MEK 5108K로 총 백혈구수를 측정하였다.

통계처리

실험결과와 유의성 SAS package의 general linear

model(GLM) procedure(SAS version 6.12, SAS Institute, 1996)을 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였으며, $P < 0.05$ 의 유의성만을 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

비장의 백혈구 비율의 변화

Prednisolone의 투여량과 투여 후의 경과일수에 따른 비장의 lymphocyte subset에서 대조군에서 T cell의 변화는 Fig 1에서 보는 바와 같이 적혈구를 제외한 비장세포 10,000개중 $32.85 \pm 7.39\%$ (range: 14.19~43.04)로 나타났다. PDS 4 mg/kg 투여군(S)은 투약종료 직후에는 32.71%로 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나, 투약 종료 1주 후에는 14.52%로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.05$). 또한 투약종료 2주 후에는 39.87%로 다시 증가하여 대조군과 유사한 수준으로 나타났다. PDS 8 mg/kg 투여군(L)의 T cell의 비율은 투약 종료 직후에 30.68%로 대조군과 유사한 수준이었으나, 1주 후에 18.66%로 대조군에 비하여 유의성 있게($P < 0.05$) 감소하였다. 그러나 2주 후에는 다시 31.58%로 증가되었다.

B-cell의 비율은 Fig 2에서 보는 바와 같이 대조군이 $31.86 \pm 8.66\%$ (range: 15.8~48.5)로 나타났으며, S군의 B cell의 비율은 투여 종료 직후, 1주 후 및 2주 후에 각각 28.88%, 23.4%, 37.79%로 1주 후에 약간 감소하였다가 2주 후에는 증가하였지만 유의성은 인정되지 않았다($P > 0.1$). L군의 B cell의 비율도 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 28.6%, 32.74%, 40.22%로 투여 종료 직후에 약간의 감소는 있었으나 투여 종료 후 2주까지 점차적으로 증가하는 것으로 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다($P > 0.1$).

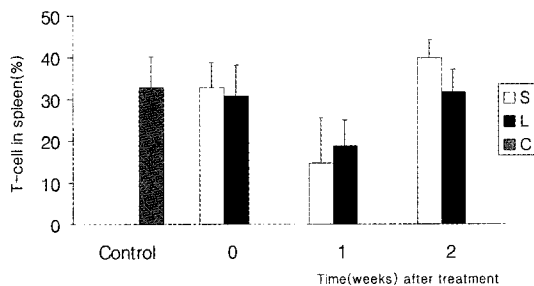


Fig 1. Changes of T cell in spleen by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

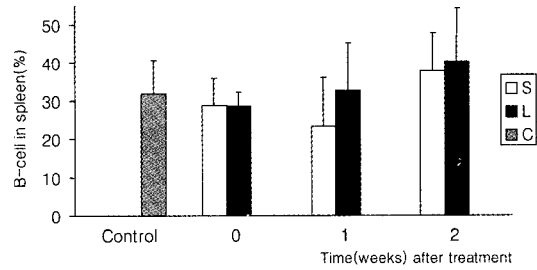


Fig 2. Changes of B cell in spleen by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

T-helper cell(Th cell)의 비율은 Fig 3에서 보는 바와 같이 대조군은 $29.47 \pm 5.64\%$ (range: 17.58~38.2)로 나타났으며, S군의 비율은 투여 종료 직후에 27.77%로 대조군보다 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 1주 후에는 13.81%로 대조군보다 유의성 있는 감소를 나타내었으며($P < 0.05$), 2주 후에는 30.2%로 대조군과 유사한 수준으로 회복하여 T cell의 변화와 유사한 경향을 보였다. L군의 Th cell의 비율도 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 26.59%, 14.11%, 25.75%로 1주 후에는 유의성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.05$).

T-cytotoxic cell(Tccell)의 비율은 Fig 4에서 보는 바와 같이 대조군은 $9.5 \pm 2.28\%$ (range: 5.64~14.88)로 나타났으며, S군의 비율은 투여 종료 직후에 8.82%로 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나 1주 후에는 4.05%로 유의성 있는 감소를 나타내었고($P < 0.05$), 2주 후에는 10.42%로 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. L군은 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에는 각각 9.18%, 6.52%, 8.85%로 나타나 1주 후에 유의

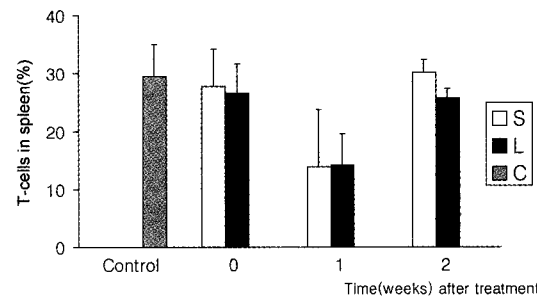


Fig 3. Changes of T-helper cell in spleen by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

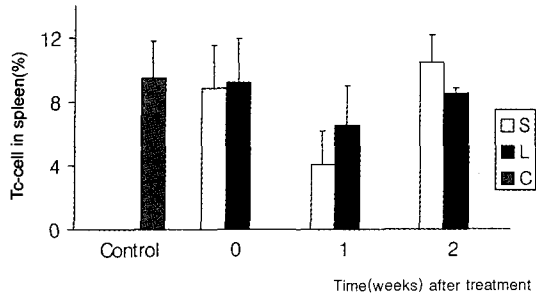


Fig 4. Changes of T-cytotoxic cell in spleen by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.05$). 2주 후에는 1주 후에 비하여 약간 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다.

Immunoglobulin 함량

혈청 중 total immunoglobulin 함량은 Fig 5에서 보는 바와 같이 대조군은 23.5 ± 8.9 mg/ml로 나타났으며, S군은 투여 종료 직후, 1주 후 및 2주 후에 각각 22.8 mg/ml, 19.3 mg/ml, 20.1 mg/ml로 대조군에 비하여 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. L군에서도 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 24.4 mg/ml, 20.4 mg/ml, 19.7 mg/ml로 나타나 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다.

체중에 대한 비장 및 흉선의 무게의 비율

체중에 대한 비장의 상대적인 무게의 변화는 Fig 6에서 보는 바와 같이 대조군의 비장무게 $\times 100$ /체중은 평균 $0.66 \pm 0.27\%$ 로 나타났으며, S군에서는 투여 종

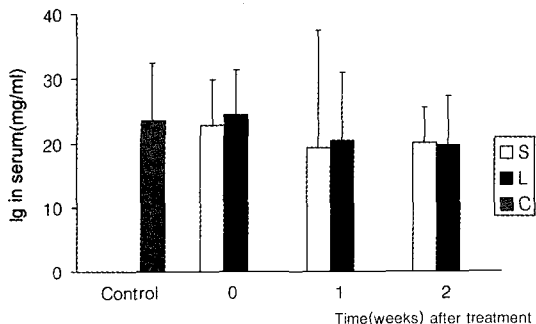


Fig 5. Changes of concentration of immunoglobulin in serum by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

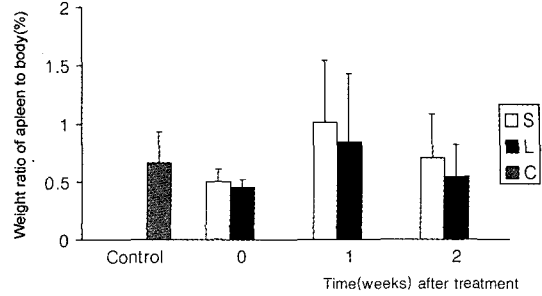


Fig 6. Changes of spleen weight by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

료 직후에 0.5%로 체중에 대한 비장 무게의 비율이 감소하여 대조군보다 낮은 수치를 나타내었으나 ($P < 0.05$), 1주 후에는 1.01%로 비율이 상승하였다($P < 0.05$). 그리고 2주 후에는 다시 감소한 0.7%로 대조군과 유사한 수준으로 회복하였다. L군은 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 0.45, 0.84, 0.54%로 투약 종료 직후에는 대조군과 유의성 있는 차이로 감소하였다($P < 0.05$), 1주 후에는 다시 증가하였고 2주 후에는 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다.

대조군의 체중에 대한 흉선 무게의 비율은 Fig 7에서 보는 바와 같이 평균 $0.33 \pm 0.14\%$ (range: 0.09~0.66%)로 나타났으나 실험군인 S군과 L군의 투여 종료 직후에는 각각 0.17과 0.18%로 나타나 유의성($P < 0.05$) 있는 감소를 나타내었다. 1주 후에는 0.22%와 0.21%로 증가하였고, 2주 후에는 0.31%와 0.29%로 증가하여 실험군 모두가 대조군과 비슷한 수준이 회복되었다.

말초혈액 중 총 백혈구 수

총 백혈구 수의 변화는 Fig 8에서 보는 바와 같이

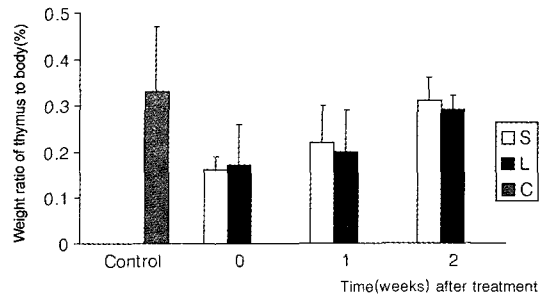


Fig 7. Changes of thymus weight by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

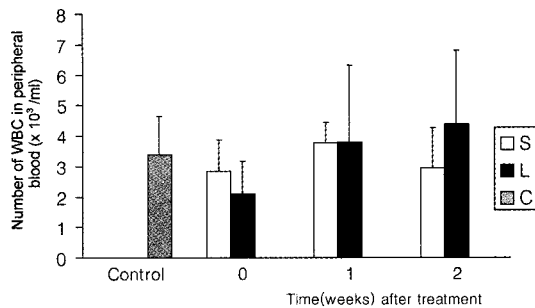


Fig 8. Changes of number of WBC by prednisolone. Sgroups : administrated with 4 mg/kg/day prednisolone. Lgroups : administrated with 8 mg/kg/day prednisolone. Cgroups : administrated with saline.

대조군은 $3.4 \pm 1.3 (\times 10^3/\text{mm}^3)$; range 1.3~6.5)로 나타났다. S군은 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 2.9, 3.8, $3.0 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 나타나 유의성있는 변화는 인정되지 않았다. 그러나 L군은 투여 종료 직후, 1주 후, 2주 후에 각각 2.1, 3.8, $4.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ 로 나타나 투약 종료 직후의 실험군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다($P < 0.05$).

고 찰

Corticosteroids제제가 소염, 대사촉진 등의 가지적 효과로 임상에서 널리 쓰이면서 corticosteroids가 면역계를 억제하는 작용이 부작용과 의원성 질환의 계기가 되는 것에 대해서 계속적인 연구가 이루어지고 있다^{8,31,32,39,44}. Corticosteroids제제에 의해 면역계가 억제되는 상태의 증거로 림프구의 감소를 볼 수 있는데¹⁵, lymphocyte가 corticosteroids에 의해 받는 영향은 동물종 및 개체의 민감성 및 lymphocyte의 유래에 따라 차이가 있다²⁰. 동량의 corticosteroids에 대하여 기니피크나 흰쥐 등은 마우스나 토끼보다 적은 영향을 받고²⁰, 개는 항염증 용량의 prednisolone에도 lymphopenia를 나타내고²⁷, T cell이 B cell에 비하여 상대적으로 많은 영향을 받으며¹⁴, T cell의 subclass에 따라 서로 영향을 받는 정도에 차이가 있다²⁰. 신체 내에 존재하는 전체 lymphocyte 중 2%만이 말초 혈액에서 순환되고 나머지 98%는 신체의 다른 부분에 분포한다⁴⁷는 점을 고려하면 말초혈액의 lymphocyte의 수치가 변하는 과정은 lymphocyte의 파괴뿐만 아니라 이동에 의한 것으로도 판단할 수 있다. Corticosteroids에 의한 lymphopenia는 주로 lymphocyte가 골수로 이동하여 일어난다^{14,15}.

항염증을 목적으로 사용되는 corticosteroids의 투여 용량은 개나 고양이에서 비교적 세분화하여 제시되고 있으나²⁷ 동물의 상태나 연구자에 따라 허용범위가 넓고 투여기간 역시 질병의 양상에 따라 많은 차이가 있다. 일반적으로 수의 임상에서 사용되고 있는 prednisolone의 권장용량은 4 mg/kg/day로 알려져 있고 과민반응에 대한 면역억제의 목적으로는 2~6 mg/kg/day를 제시하고 있다³⁵. 본 실험에서 prednisolone을 4 mg/kg/day와 8 mg/kg/day의 용량으로 4일 동안 투여한 직후, 1주 후 및 2주 후에 비장의 lymphocyte를 관찰한 결과 T cell, Th cell 및 Tc cell은 투여 종료 1주 후에 가장 낮은 수치를 나타내었으나 2주 후에는 비교적 정상 수준으로 회복하였다. 그러나 B cell은 뚜렷한 변화는 없었다. 본 실험에서는 외인성으로 단기간 prednisolone을 투여한 것은 다르지만 비장에서 lymphocyte subset의 변화에 관한 You-ten 등⁴⁶의 보고에서 graft-versus-host disease(GVHD)를 유발시킨 mouse는 상승된 내인성 glucocorticoids로 인하여 Th cell(CD4+)과 Tc cell(CD8+)이 뚜렷하게 감소한 것을 관찰하였다고 보고하였는데, 특히 어느 한 쪽이 더 많은 영향을 받지는 않는다고 한 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 또한 Th cell과 Tc cell의 감소 차이가 없는 것은 Haynes와 Fauci¹⁹가 Th cell이 Tc cell보다 많은 영향을 받는다고 보고한 것과 차이가 있다. 이것은 본 실험에서 T cell을 관찰한 장기가 비장인 것과 corticosteroids를 단기간, 소량 투여한 것에 관련된 차이인 것으로 사료된다. B cell은 뚜렷한 변화를 나타내지 않은 것은 Fauci¹⁴가 corticosteroids에 의하여 전체 lymphocyte가 감소하는데 T cell에 비하여 상대적으로 B cell이 영향을 적게 받는다고 한 보고와 같은 견해로 단기간의 소량 투여에 의해서도 세포성 면역의 억제가 일어나고, 면역성 억제의 회복에 소요되는 시간은 투여 종료를 기점으로 약 2주가 걸리는 것으로 사료된다.

Lymphocyte의 감소율과 처치 용량간에는 상관관계는 적은 것으로 알려진 것과 같이^{38,40} 권장 투여용량을 사용한 실험군과 100% 증가시킨 실험군은 lymphocyte의 유의성 있는 변화가 인정되지 않았다.

Corticosteroids가 immunoglobulin의 생산에 미치는 영향은 아직 여러 연구자들에 의해 논의되고 있으며 Dannenberg¹⁰는 mouse에서는 glucocorticoids를 약리학 적 용량으로 사용해도 항체의 합성이 억제된다고 하였고, Butler와 Rossen⁵는 3내지 5일간의 고용량의 methylprednisolone의 투여시에 혈청의 IgG 함량이 감소한다고 보고하였으며, Tito 등⁴³은 12주간 methylpre-

dnisolone을 5 mg/kg/day씩 복강 내로 투여한 mouse에서 혈장 내 IgG 함량이 감소하였음을 보고하였다. In vivo에서는 Harald 등¹⁷이 tonsil에서 분리한 mononuclear cell culture에서 methylprednisolone에 의하여 IgG와 IgE의 생산이 감소했음을 보고하였다. 그러나 Haruo 등¹⁸은 TNP-SRBC로 지연형 과민반응을 일으킨 mouse에서 prednisolone을 0.5 mg/kg/day씩 10일간 투여하여도 IgM과 IgG의 생산에 유의성 있는 변화를 주지 못하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 mouse에게 prednisolone을 4~8 mg/kg/day씩 4일 간 투여하였을 때 혈청 중의 총 immunoglobulin 농도는 대조군에 비하여 유의성 있는 변화가 없었는데, 이것은 Haruo 등¹⁸의 보고와 유사한 것으로 보인다. 그러나 본실험에서는 혈청 중의 total immunoglobulin을 관찰한 것이기 때문에 immunoglobulin subclass가 받는 영향에 대해서는 알 수 없었지만 전체 immunoglobulin의 85%를 차지하는 IgG의 혈청 중 반감기가 23일이라는 점을 고려할 때²⁴, prednisolone의 투여용량과는 관계없이 total immunoglobulin이 다소 감소한 경향을 나타내었다.

Corticosteroids가 lymphocyte의 이동에 미치는 영향이 guinea pig에서 연구된 것에 의하면 흉선²⁶과 비장¹³에서 lymphocyte의 수출이 증가하고, 그리고 corticosteroids에 의한 lymphopenia에 흉선의 무게감소와 비장, 림프질의 수축도 동반된다^{4,25}. Kobayashi 등²⁵은 prednisolone, betametasone, hydrocortisone을 투여한 mouse에서 corticosteroids의 종류와는 무관하게 투여용량이 증가할수록 체중에 대한 비장의 무게의 비율이 감소하는 정도가 커졌다고 보고하였으며, Shuzo 등³⁸은 52주 동안 prednisolone farnesylate gel을 바른 rat에서의 변화를 관찰하였는데, 실험기간 동안 실험군의 흉선과 비장의 무게가 대조군에 비해 낮다고 보고하였다. 지금까지 선인들의 연구 결과는 prednisolone을 mouse에 투약하였을 때 흉선과 비장의 무게가 감소된 본 실험의 결과와 유사성을 보이며, prednisolone의 투여기간이 짧아도 흉선과 비장에 미치는 영향은 직접적이고 큰 것으로 사료된다.

비장의 무게는 투약종료 1주 후에 정상수준 이상으로 유의성이 있는 증가를 보였다가 다시 감소하여 정상수준으로 회복하는 것에 대해서는 비교할 만한 문헌을 찾지 못하였으나 prednisolone 투여에 의해 비장의 기능이 저하되었다가 투여중단에 의해 기능이 회복된 결과인 것으로 사료된다.

Corticosteroids를 투여하면 lymphocyte와 eosinophil은 감소하고 neutrophil은 증가한다^{2,12,20,33,35}. Shuzo 등³⁸

은 prednisolone을 장기간 적용시킨 rat에서 대조군의 백혈구 수에 비하여 실험군의 백혈구수가 낮고, 또한 lymphocyte의 비율도 낮음을 보고하였는데 본 실험에서도 실험군의 말초 혈액에서의 총 백혈구 수는 투약 직후에 대조군에 비하여 감소하였고 감소율은 투여용량이 높은 군에서 높았다. 이러한 현상은 투여용량이 어느 수준까지 증가하면 증가할 수록 neutrophil은 증가하지만 lymphocyte와 eosinophil의 감소는 필수로의 이동이 증가하기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때 단기간의 prednisolone 처방으로 인한 면역기계의 일련의 변화에서 특히, 세포성 면역성의 저하가 인정되었으며 회복에 요하는 기간은 약 2주가 소요되었다. 그러므로 prednisolone 처방을 받은 환축에서는 투약 종료 후 2주간은 항병력 약화로 인한 기회감염 특히, virus성 감염에 대한 감수성이 높아지기 때문에 특별한 관리가 요구된다.

결 론

공시동물인 ICR-mice에게 합성 corticosteroids인 prednisolone을 small dose(S. 4 mg/kg/day)과 large dose(L. 4 mg/kg/day) 및 대조군으로 나누어 4일 동안 경구투여하고 투약기간이 끝난 직후와 1주일 후 및 2주일 후의 3군으로 나눈 공시동물로부터 비장과 흉선 및 혈액을 채취하여 신체의 면역성과 관련된 요소들을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험군의 비장에서 T cell과 Th cell, Tc cell의 비율은 투여가 끝난 직후 보다 1주가 지난 후에 각각 유의성 있는 감소($P < 0.05$)를 하였으며 2주가 지난 후에는 대조군과 유사하게 회복되었으나, B cell은 유의성이 있는 변화를 내지 않았다.
2. 혈청 중의 총 immunoglobulin의 농도는 4~8 mg/kg/day의 prednisolone의 투여에 크게 영향을 받지 않았다.
3. 체중에 대한 비장의 무게의 상관관계는 prednisolone의 투여에 의해 투여직후에 유의성 있는($P < 0.05$) 감소가 인정되었으나 1주 후에는 정상이상으로 증가하였다가 2주 후에는 대조군과 유사한 정도로 회복하였다.
4. 체중에 대한 흉선의 무게의 상관관계는 prednisolone의 투여에 의해 투여직후에 유의성 있는($P < 0.05$) 감소가 인정되었으나, 그 후에는 증가하여 2주 후에는 대조군과 유사한 정도로 회복하였다.
5. 말초혈액 중의 총 백혈구 수는 유일하게 8 mg/

kg/day용량 투여군에서 투여 종료 직후에 한하여 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$).

참 고 문 헌

- Badylak SF. and Van Vleet JF. Sequential morphologic and clinicopathologic alterations in dogs with experimentally induced glucocorticoid hepatopathy. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1310-1318.
- Berlinger FG. Use and misuse of steroids. *Postgraduate Medicine*. 1974; 55: 153-157.
- Bowen JM. Are corticosteroids useful in shock therapy? *JAVMA* 1980; 177: 453.
- Braceni D, Arnason BG. Tymic involution and recovery: immune responsiveness and immunoglobulins after neonatal prednisolone in rats. *Immunology* 1966; 10: 35.
- Butler WT, Rossen RD. Effects of corticosteroids on immunity in man. I. Decreased serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high doses of methylprednisolone. *J Clin Invest* 1973; 52: 2629.
- C. Roland Leeson, Thomas S. Leeson, Anthony A. Paparo. *Text/Atlas of Histology*. Saunders 1987
- Chastain CB. Use of corticosteroids. in "Textbook of veterinary internal medicine". Ettinger, SJ. ed. U. S. A. 1975; 413-428.
- Cockburn I. Assessment of the risks of malignancy and lymphomas developing in patients using Sandimmune. *Transplant proc* 1987; 19: 1804-1807.
- Coles EH. Adrenal and pituitary function. in "Veterinary clinical pathology". W. B. Saunders. Philadelphia 1986: 217-225.
- Dannenbergh AM Jr. The antiinflammatory effects of glucocorticosteroids: a brief review of the literature. *Inflammation* 1979; 3: 329.
- Debons AF, Zurek LD, Tes CS, et al. Central nervous system control of hyperphagia in hypothalamic obesity : dependence on adrenal glucocorticoids. *Endocrinology* 1986; 118: 1678.
- Dillon AR. et al. Prednisolone induced hematologic, biochemical, and histological changes in the dog. *JAAHA* 1980; 16: 831-837.
- Ernst m U, Sandberg G. Regulation of output of lymphocytes from the spleen. II, aquantitative investigation in shamoperated and thymectomized guinea-pig during steroid-induced involution and regeneration, *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 76: 52-60.
- Fauci AS. Corticosteroids and circulating lymphocytes. *Transplantation Proceedings* 1975; 7, No. 1. march.
- Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 1975; 28: 669-680.
- Feldman EC. Nelson RW. Glucocorticoid therapy. in "Canine and feline endocrinology and reproduction". WB. Saunders. Philadelphia 1987: 218-228.
- Harald R, Bruce DM, Erwin WG. Differential inhibition of T and B cell function in IL-4-dependent IgE production by cyclosporine A and methylprednisolone. *The journal of Immunology* 1990; 145: 3641-3646 (11).
- Haruo Y, Yuriko F, Kazuhiko Y. et al. A new assay system detecting antibody production and delayedtype hypersensitivity responses to trinitrophenyl hapten in an individual mouse. *Int J Immunopharmac* 1996; Vol 18, 1: 31-36.
- Haynes BF. Fauci AS. The differential effect of in vivo hydrocortisone on the kinetics of subpopulations of human peripheral blood thymus-derived lymphocytes. *J Clin Invest* 1978; 61: 703.
- Henry N, Claman MD. Corticosteroids and lymphoid cells. *N Engl J Med*. Aug 1972; 24: 388-397.
- Jiro J. Kaneko. In "Clinical Biochemistry of Domestic Animals" 4th pp. Academic press, Inc 1989; 616-617.
- Kemppainen RJ, Thompson FN, Lorenz MD, et al. Effects of prednisolone on thyroid and gonadal endocrine function in dogs. *J Endocrinol* 1983; 96: 293.
- Kemppainen RJ. Principles of glucocorticoid therapy in nonendocrine disease. in "Current veterinary therapy IX". Kirk RW. edition, WB. Saunders, Philadelphia 1986: 954-962.
- Ken SR, James ST. *Microbiology & Immunology*. Mosby 1996; 7-20.
- Kobayashi F, Hattori Y, Koshi T, Nagoya T. Effect of prednisolone 17-valerate 21-acetate on immunological response in mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1980; 76(5): 363-372.
- Larsson B. Export and import of 3H-thymidine-labelled lymphocytes in the thymus of normal and steroid-treated guinea pigs. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967; 70: 390-397.
- Moore GE, Mahaffey EA, M. Hoenig, Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs. *Am J Vet Res* 1992; 53: 6.
- Munck A, Guyre PM. Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; 5: 25.
- Papich MG. and Davis LE. Glucocorticoid therapy. in "Current veterinary therapy X", Kirk, R. W. ed: 54-62.
- Paraskevas F, Foerster J. Immunodiagnosis. in: Lee GR, Bithell TC, Forester J, Athens IW, Lukens JN (eds) *Wintrobe'S Clinical Hematology*, 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia 1993; 499-508.

31. Penn I. The changing pattern of posttransplant malignancies. *Transplant proc.* 1991; 23: 1101-1103.
32. Penn I. Tumors of the immunocompromised patient. *Annu Rev Med.* 1988; 39: 63-73.
33. Peterson ME, Altszuler N. Suppression of growth hormone secretion in spontaneous canine hyperadrenocorticism and reversal after treatment. *Am J Vet Res* 1981; 42.
34. Peterson ME. In "Current Veterinary Therapy IX" (R. W. Kirk, ed), Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 1986; 963.
35. Plumb DC. *Veterinary Drug Handbook.* Iowa state university press. Iowa U. S. A. 1995.
36. S. Raziuddin, MA. Nur and AA. AL-wabel. Increased circulating HLA-DR+CD+ T cells in systemic lupus erythematosus: Alterations associated with prednisolone therapy. *Scand J Immunol* 1990; 31: 139-145.
37. Selye H. In "Hormones and Resistance." Springer-Verlag Berlin 1971.
38. Shuzo O, Susumu N, Kazutoshi T. et al. A 52-week dermal toxicity study of prednisolone farnesylate (PNF) gel in rats with a recovery period of 8 weeks. *J Toxicol Sci* 1992; 17, suppl. III: 91-122.
39. Simmons RL, C. Lopez HH, Balfour Jr. et al. Cytomegalovirus: clinical virological correlations in renal transplant recipients. *Ann Surg* 1974; 180: 623-634.
40. Stefano R, Alessandro R, Flavio G. et al. Methylprednisolone dosage effects on peripheral lymphocyte subpopulations and eicosanoid synthesis. *Kidney International.* 1992; 42: 981-990.
41. Streeten DHP. Corticosteroid therapy I. Pharmacological properties and principles of corticosteroid use. *JAMA* 1975; 232: 944-947.
42. Sue EA, Paul KH. Cell-mediated cytotoxicity; Ahighly sensitive and informative flow cytometric assay. *J Immune Methods* 1989; 117, 205-214.
43. Tito C, Kerry G, Norman AG. Murine Lupus Nephritis Effects of glucocorticoid on circulating and tissue-bound immunoreactants. *Laboratory Investigation* 1983; 49:4: 476.
44. Torantore KM, K. Reed and R. Venuto. 24-hour immunologic assesment of CD4 ϵ ' and CD8 ϵ ' lymphocytes in renal transplant recipients receiving chronic methylprednisolone. *Clin Nephrol* 1995; Nov;44:(5): 290-8.
45. Weatermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 1990; 11: 406-410.
46. You-Ten KE, Lapp WS. The role of endogenous glucocorticoids on host T cell populations in the peripheral lymphoid organs of mice with graft-versus-host disease. *Transplantation.* Jan 1996; 15: 61(1): 76-83.
47. 류영수, 박최규, 장정호. 가축질병진단. 수의과학연구소. 안양. 1997; 120-122.