흰쥐에서 소량의 출혈 전처치가
대량출혈 후 면역저하에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

정 성 필

흰쥐에서 소량의 출혈 전처치가 대량출혈 후 면역저하에 미치는 영향

지도 박 정 수 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 사 업 단

정 성 필

정성필의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

이 논문을 준비하고 진행하며 마무리하기까지 모든 과정을 꼼꼼히 챙겨 주셨을 뿐만 아니라 석사 과정에서부터 제가 여기에 이르기까지 저의 모든 부덕과 게으름에도 불구하고 사랑과 인내로써 헤아려 주신 박정수 지도교수님께 지면으로나마 그 동안 드리지 못했던 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 논문의 세세한 부분까지 저의 부족한 부분을 충고와 권면으로 메워주시고 심사하여 주신 이한식 교수님, 지훈상 교수님, 최승훈 교수님, 이수곤 교수님께 감사드립니다.

경험이 일천한 동물 실험 과정에 많은 도움을 주신 응급의학교실의 김승호 교수님을 비롯한 여러 교실원들과 임상의학연구센터의 조교 선생님들께도 감사를 드립니다. 아울러 논문 준비 기간에 대신 환자를 돌보아 주신 충남대병원 응급의학과 식구들에게도 감사를 드리고 싶습니다.

또한 이 논문을 준비하는 과정에서 관심과 격려로 항상 힘이 되어 주신 양가 부모님께 못 다 드린 감사의 말씀을 올리고, 매 순간마다 최고의 후원자이자 동반자인 사랑하는 아내 수미와 이 영광을 함께 나누고 싶습니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례

국문요약

흰쥐에서 소량의 출혈 전처치가
대량 출혈 후 면역저하에 미치는 영향

면역저하는 외상으로 인한 후기사망의 주요한 원인이다. 심한 출혈로 면역이 저하됨이 동물실험에서 밝혀졌다. 출혈 및 외상에 의한 면역저하를 개선하기 위한 여러 시도가 있었으나 아직 임상에 도입된 것은 없는 실정이다. 저자들은 출혈로 인한 면역저하를 조절하기 위하여 신체의 적응력을 이용할 수 있는지 알아보고자 하였다. 출혈에 대한 적응현상은 아직까지 보고된 바 없으나 반복적으로 투여된 내독소(endotoxin)에 대하여 적응현상을 보이는 내독소 관용 현상은 오래 전부터 알려졌으며 최근 내독소 관용이 출혈성 쇼크에 대한 적응과 관련이 있음이 알려졌다. 또한 출혈성 쇼크를 전처치하면 48시간 후의 출혈성 쇼크에 대해 생리적인 보호효과가 있음도 알려졌다. 따라서 본 연구에서는 면역저하를 유발할 수 있는 출혈을 일으키기 전에 소량의 출혈을 전처치하여 면역증강 효과를 유도할 수 있는지 알아보고자 하였다.

먼저 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 총 혈액량의 0, 10, 20, 30% 출혈을 유발하고 1, 2, 4, 7일 후에 면역저하 정도를 살펴보았다. 또 출혈 전에 면역저하를 유발하지 않을 정도의 출혈 전처치(10%)를 출혈 사이의 간격을 다르게 시행하여 출혈로 인한 면역저하 정도가 어떻게 변화하는지를 살펴보았다. 면역저하의 정도를 측정하기 위한 방법으로는 말초 임파구의 아군분포, 비장세포의 concanavalin A(Con A) 자극에 대한 증식능 및 IL-2 분비 정도를 이용하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

1. 출혈 후 출혈량 및 시간 경과에 따른 말초 임파구 아군의 분포는 유

의한 차이가 관찰되지 않았다.

2. Con A 자극에 대한 비장세포 증식능은 총 혈액량의 20% 이상 출혈군에서 출혈 2일째에만 감소하였다.

3. 10% 출혈 후 20% 출혈을 유발하기까지의 기간이 7일인 경우에는 출혈 사이의 간격이 1일 또는 2일인 경우에 비해 비장세포의 Con A 자극에 대한 증식능이 높았다.

4. 비장세포의 증식능의 저하를 유발하는 20% 출혈 7일 전에 10% 출혈 전처치를 시행하면, 출혈 전처치 없이 20% 및 30% 출혈을 유발하는 것에 비해 Con A 자극에 의한 비장세포의 증식능이 증가하였다. 그러나 출혈 간격이 2일인 경우에는 이런 현상이 관찰되지 않았다.

5. 10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유도하고 1, 2, 4일 후의 Con A 자극에 대한 비장세포 증식능을 비교하였는데 1일 후가 4일 후보다 의미있게 비장세포 증식능이 높았다.

6. 출혈 간격이 7일인 경우에는 10－20% 군이 0－30% 군에 비해 IL-2 분비가 증가하였고, 10－20% 출혈 1일 후가 4일 후보다 IL-2의 분비량이 많았다.

결론적으로 면역저하를 유발하지 않는 정도의 출혈이 사전에 주어진 상태에서 다시 한번 면역저하를 일으킬 정도의 출혈을 시켰을 때 출혈간의 시간 간격에 따라 나타나는 면역반응은 달라지며, 출혈간의 간격이 7일인 경우에는 단독으로 면역저하를 유발하는 출혈에도 불구하고 오히려 면역기능의 증가가 관찰되었다. 그러나 이 효과는 두번째 출혈 후 1일 정도의 짧은 기간에만 나타났다.

핵심되는 말: 출혈, 면역저하, 적응기전

흰쥐에서 소량의 출혈 전처치가 대량 출혈 후 면역저하에 미치는 영향

<지도 박 정 수 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

정 성 필

I. 서 론

의학의 급속한 발전에도 불구하고 아직 많은 수의 외상 환자들의 주요 사망원인이 감염이나 다발성 장기부전(multiple organ failure; MOF)으로 밝혀지고 있다. 외상 후 MOF는 면역기능과도 밀접한 관련이 있는데 심한 외상이 면역기능에 영향을 미친다는 것은 잘 알려져 있다. 임상적으로 외상은 조직 손상, 출혈, 골절 등이 혼합되어 나타나며 이들이 복합적으로 작용하여 면역계에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 동물 실험에서는 심한 출혈, 조직 손상, 골절 및 화상에 의해 각각 면역저하가 관찰되었으며 이들이 혼합되어 있을 때는 각각의 경우보다 더 심한 면역저하가 유발된다고 한다.[1-7] 이렇게 이질적인 손상이 혼재되어 있기 때문에 외상에 대한 모델을 만들기가 어려운 가운데 최근에는 출혈 모델이 많이 연구되어지고 있다.

출혈이 면역저하를 유발한다는 것은 여러 실험을 통하여 알려지게 되었는데 마우스에서 60분간 출혈성 쇼크를 유도한 후 소생시키는 고정혈압 출혈 모델에서는 Concanavalin A(Con A)의 자극에 의한 비장세포 증식능이 억제되며, 패혈증을 유발시켰을 때 사망률이 58%에서 100%로 증가되었다고 한다.[1] 또한 총 혈액량의 30%를 제거한 흰쥐의 고정혈량 출혈 모델에서도 Con A에 대한 비장세포의 증식능과 IL-2의 생산이 감소하였다고 한다.[8]

출혈 후의 면역 저하 현상을 개선하기 위하여 여러 약물들이 연구되어 왔으며 칼슘 차단제, 혈소판 활성화 인자 억제제, 고장성 식염수, 프로락틴, 멜라토닌, 안드로겐 억제물질인 flutamide, metoclopramide, estradiol, 성호르몬의 전구물질인 dehydroepiandrosterone 등이 동물실험에서 효과가 있다고 보고되었으나 아직 임상에 도입되지는 못하고 있다.[9-18] 그 이유는 외상이 다양한 이질적인 손상으로 이루어져 있고 각각의 손상이 어떤 기전을 거쳐서 면역저하를 유발하는지를 확실히 모르기 때문이며 면역 반응에 관여하는 요소가 너무 많고 다양하기 때문에 그 기전을 확실하게 이해하려면 앞으로도 많은 시간과 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 외상으로 인한 면역저하를 신체의 면역기능을 이용하여 조절할 수 있는지를 알아보고자 한다. Harris와 Gelfand는 외상으로 면역저하가 일어나는 것을 상처가 자가 항원으로서 역할을 하는 것이라고 주장하였으며, 단순한 출혈만으로도 면역계에 영향을 미치는 것을 보면 세포의 허혈이라는 스트레스가 면역계에 영향을 준다고 생각할 수 있다.[1,19] 면역계는 한번 노출된 항원에 대해서는 기억을 하고 있다가 재차 그 항원이 침입했을 때 예전의 기억을 되살려 반응을 하게 되며 뿐만 아니라 스트레스만으로도 면역계에 영향을 미칠 수 있음이 알려졌다.

흰쥐를 유리관에 넣어 움직이지 못하게 하거나 약하게 흔드는 스트레스를 주면 지연형 과민증과 같은 항원특이 세포면역이 증강됨이 관찰되었다.[20] 또한 스트레스를 가한지 2시간 안에 말초혈 내의 T, B임파구, 자연살세포, 단핵구 등의 절대수가 40-75% 정도 감소하고 스트레스가 없어지면 3시간 정도 후에 정상으로 회복되는 것을 보고하였다.[21] 또 스트레스의 종류에 따라 급성 스트레스는 세포면역을 증강시키며 만성 스트레스는 세포면역을 억제한다는 것이 알려졌으며, 흰쥐를 자기장에 노출시키면 노출시간에 따라 2주 후에는 T임파구의 Con A에 대한 증식이 증가하지만 4주 후

에는 감소하기 시작하여 13주 후에는 억제되는 양상이 관찰되었다.[22,23] 이와같이 스트레스는 면역계에 영향을 주며 종류와 기간등에 따라 면역기능을 증강 또는 억제시킬 수 있음을 알 수 있다.

그러면 출혈로 인한 면역저하를 조절하기 위하여 출혈 전에 소량의 출혈로 스트레스를 유발하여 면역증강 효과를 기대할 수는 없을까? 이러한 적응현상은 Noble등이 sublethal drum trauma를 주면 계속된 외상에 대한 적응현상을 보이는 것을 관찰하였으며 Zweifach등은 drum-rolling trauma가 계속된 내독소 주입에 비교적 저항성을 보이는 것을 관찰하였으나 출혈에 대해서는 보고된 바 없다.[24,25] 이와 같이 최근에 주어진 자극에 기초하여 두번째 자극에 대하여 다른 양상으로 반응하는 능력을 priming 또는 preconditioning이라고 한다.[26] 면역계에도 이와 유사한 현상으로 내독소에 반복 노출될 때 첫 번째 자극에 비해 점차 반응이 둔화되는 현상인 내독소 관용(endotoxin tolerance)이 보고되었다. 흰쥐의 출혈성 쇼크 모델에서 4일 동안 용량을 증가시키면서 내독소를 복강내 주사하면, 24시간 생존율이 40%에서 89%로 증가되며, 내독소 관용을 유발한 흰쥐는 출혈성 쇼크로 인한 사망율이 80%에서 20%로 감소되고, 간의 허혈 재관류 손상으로 인한 사망이 감소한다고 한다.[27-29]

반복된 출혈에서도 이러한 적응현상이 존재하는지는 아직 연구되지 않았으나 최근 들어 출혈이 여러 종류의 자극에 대한 보호작용을 할 수 있다는 사실이 알려지게 되었다. 먼저 출혈은 어떤 상황에서는 연속된 패혈성 쇼크에 보호작용을 하게 되는데, 마우스에서 심장천자를 통하여 30 ml/kg의 출혈을 유발한 후 24시간 후에 치명적인 용량의 내독소를 복강내 주사하면 96시간 생존율이 5%에서 67%로 높아졌다고 한다.[30] 흰쥐에서도 심장천자로 20 ml/kg의 출혈을 유도하고 24시간 후 치사량의 내독소를 복강내 주사하면 IL-1, TNF mRNA의 발현이 둔화되는 보호효과가 있다고 하였

다.[31] 또 출혈이 조직손상에 대한 보호작용을 할 수도 있는데 마우스에서 출혈성 쇼크를 유발하면 폐손상이 유발되는데, 출혈 5일 후 개복술을 시행한 군은 오히려 폐손상이 적었다고 한다.[32] Zervos등은 흰쥐에서 평균 동맥압 30 mmHg로 30분간 유지하면 50%의 치사율을 보이는데 비해 48시간 전에 평균 동맥압 30 mmHg로 15분 동안 유지한 뒤 수혈하는 전처치를 시행하면 생존율이 의미있게 증가하고 생리적인 지표가 정상화된다고 하였다.[33]

이와 같이 선행된 출혈이 여러 세포 및 장기에 대해 영향을 미친다면 면역계도 선행된 출혈에 대하여 어떤 반응을 보일 것으로 예상할 수 있다. 연구자는 외상 후 면역저하의 기전이 복잡하기 때문에 한두가지의 약물로 그 기전을 멈추기는 힘들다고 생각되며 신체의 고유한 보호기능을 유발시키는 방법을 모색하고자 한다. 이에 저자들은 면역저하를 유발하지 않을 정도의 출혈이 전처치 된 상태에서 다시 한번 면역저하를 일으킬 정도의 출혈을 유발시켰을 때 면역반응의 양상이 어떻게 변화되는지 연구해 보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 출혈 조작

실험동물은 몸무게 300 350 g의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 동물은 연세의대 실험동물부에서 공급받았으며 온도 22℃, 습도 55%의 SPF(specific pathogen free) 환경에서 사육되었다. 5% halothane(일성제약, 천안, 한국)으로 흡입마취를 유도하고 폐쇄 공간에서 3% halothane과 N_2O와 O_2를 같은 비율로 마취를 유지하였다. 심장 부위의 피부를 70% ethanol로 세척 및 소독한 후 26G 무균 주사기를 이용하여 경피적으로 흉골 아랫쪽 ¼ 지점의 좌측연에서 심장을 천자(cardiac puncture)하여 출혈을 유도하였다. 흰쥐의 총 혈액량을 kilogram 당 75 ml로 계산하여 각 군에 해당하는 출혈을 유발시켰으며 수액이나 혈액의 재공급은 하지 않았다. 체중으로 환산하면 10% 출혈은 7.5 ml/ kg, 20% 출혈은 15 ml/ kg, 30% 출혈은 22.5 ml/ kg에 해당한다. 각 군별 출혈 정도 및 출혈 조작의 시간 간격은 그림 1과 같고 출혈 조작 시간은 1분 이내, 총 흡입마취 기간은 3분 이내였으며 본 모델의 사망률은 4%였다. 출혈 조작시 3회 이상의 심장천자를 시행한 경우나 흉벽에 혈종이 생긴 경우는 실험에서 제외하였다.

흰쥐는 혈액을 채취한 후 산소를 공급하며 마취에서 회복될 때까지 관찰한 다음 우리에 넣고 물과 먹이를 자유롭게 먹도록 하였다. 출혈 후 일정

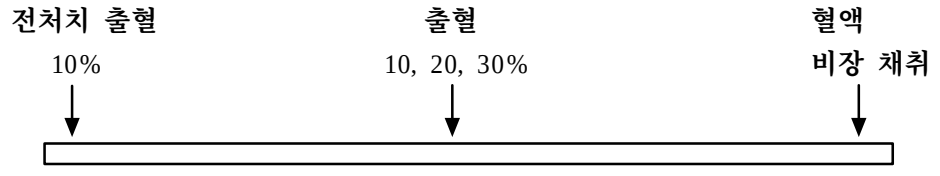

그림 1. 출혈 조작의 시간별 모식도. 총 혈액량의 10, 20, 30% 출혈을 유발하고 일정 시간 후에 흰쥐를 희생시켜 혈액과 비장을 채취하였다. 이차 실험에서는 출혈 전에 10%의 전처치 출혈을 유발시켰다.

시간 후에 같은 방법으로 흡입마취 시킨 후 경추탈구를 일으켜 희생시킨 다음 심장천자로 혈액을 채취하였고 70% ethanol로 몸 전체를 소독한 후 무균적으로 비장을 적출하였다.

한번의 출혈을 유발하고 면역기능을 살펴본 일차 실험은 160마리의 흰 쥐를 (1) 아무것도 시행하지 않은 대조군, (2) 심장천자만 시행하고 출혈은 유발하지 않은 대조군, (3) 10% 출혈군, (4) 20% 출혈군, (5) 30% 출혈군의 다섯 군으로 나누어 각각 출혈조작 후 1, 2, 4, 7일 후에 희생시켜 면역반응을 조사하였다. 다양한 시간 간격에 따라 두 번의 출혈을 유발하고 면역기능을 살펴본 이차 실험은 10% 출혈을 전처치 한 다음 1, 2, 4, 7일 후에 20% 출혈을 유도하여 비장세포의 증식능을 비교하였고 필요에 따라 비장세포의 IL-2 분비량을 측정하였다. 모든 군은 8마리씩으로 하였다.

2. 비장세포 분리

적출된 비장은 4℃ phosphate buffered saline(PBS)가 담긴 petridish에서 무균적으로 금속 mesh(60 mesh, Sigma, St. Louis, MO, USA)에 통과시켜 잘게 만든 후, pore 크기가 53㎛인 nylon mesh 위로 옮겨 통과시켜 비장세포액을 얻었다. 이를 10% 우태혈청(fetal bovine serum, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 100U/ml의 penicillin, 100㎍/ml의 streptomycin이 첨가된 RPMI 1640(Sigma, St. Louis, MO, USA, 이하 Sigma) 배양액에 부유시켰다. 원심분리 후 침전된 세포에 Tris-NH_4Cl 용액(pH 7.6, Sigma)을 가하여 적혈구를 용해시킨 다음 곧 2배 농도의 배양액을 가하여 등장액으로 만든 후 원심분리하였다. 침전 세포를 다시 배양액에 부유시킨 후 Trypan blue(Sigma)로 염색하여 세포의 생존여부를 확인한 다음 실험에 이용하였다.

3. 비장세포의 증식능 측정

비장세포를 96-well plate에 각각 1×10^6개의 세포수가 되도록 100㎕씩

분주하고 mitogen인 Con A(Sigma)를 well당 2μg이 되도록 10μℓ씩 가하였다. 이를 37℃, 5% CO_2 항온항습기에서 96시간 동안 배양하였다. 배양 72시간 째에 각 well당 1μCi/10μℓ의 [methyl-^{3}H]-thymidine(NEN, Boston, MA, USA; specific gravity 6.7 Ci/mmol)를 넣고 24시간 더 배양한 후 세포수확기(Skatron Instruments, Sterling, VA, USA)를 이용하여 fiber glass filter mat에 통과시켜 비장세포를 수확하였다. 수확된 비장세포를 scintillation vial에 담아 scintillation cocktail(Aquasol-2; Packard, Meriden, CT, USA)을 첨가하여 liquid scintillation counter(LS 5000 TA; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)로 베타선을 측정하였다. 모든 실험은 삼배수로 시행하였으며 Con A를 첨가하지 않은 용기의 방사선을 측정하여 대조군으로 이용하였다. 비장세포 증식능 측정의 시간별 모식도는 그림 2와 같다.

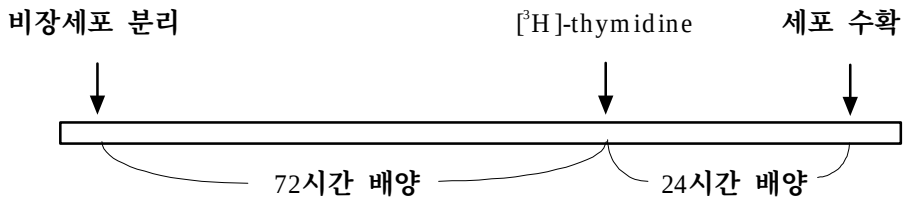

그림 2. 비장세포 증식능 측정법의 시간별 모식도. 비장세포를 분리하여 Con A로 자극한 다음 72시간 배양하다가 [^{3}H]-thymidine을 첨가하고 24시간 더 배양한 후 세포를 수확하여 증식능을 측정하였다.

4. 임파구 아군 분포의 분석

말초혈액 2ml을 EDTA가 처리된 시험관에 담아 일반혈액 검사기(Gen-S, Coulter Corp, Miami, FL, USA)를 이용하여 말초 혈구를 계수하여 헤마토크릿, 백혈구 수 및 임파구 분율을 측정하였다. 절대 임파구 수는 백혈구 수에 임파구 분율을 곱하여 계산하였다.

한편 시험관(Falcon #2052)에 20㎕의 단클론 항체(Serotec, Raleigh, NC, USA)를 넣고 100㎕의 혈액을 첨가하였다. 단클론 항체로 T세포에는 CD3, 보조 T세포에는 CD4, 세포독성 T세포에는 CD8, B세포에는 CD45RA를 사용하였으며 CD3와 CD4에는 Fluorescein isothiocyanate(FITC)가, CD8과 CD45RA에는 R-phycoerythrin(R-PE)이 결합된 제품을 사용하였다. 4℃의 암실에서 30분간 반응시킨 후 FACS lysing solution(Becton Dickinson, San Jose, SA, USA)을 첨가하고 10분간 반응시켰다. 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS로 두차례 세척한 후 0.5ml의 PBS에 부유시킨 다음 FACS-Calibur(Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 유세포분석을 시행하였고 측정 결과는 PC-LYSIS 프로그램을 이용하여 분석하였다.

5. 비장세포의 IL-2 분비량의 측정

비장세포 단일세포액의 일부를 시험관에 넣고 20 ㎍/ml의 Con A로 자극시킨후 RPMI 1640과 10% 우태혈청이 포함된 배양액에서 37℃, 5% CO_2 항온항습기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포 부유액을 0.22㎛의 필터가 부착된 syringe로 걸러 −70℃에서 보관하였다. 배양 상층액 내의 IL-2를 rat IL-2 효소면역흡착검사 Kit(Cytoscreen, Biocource International, Camarillo, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 상층액 및 일정한 농도로 희석된 표준 용액을 anti rat IL-2가 부착된 96-well plate에 각각 50㎕씩 분주하고 상온에서 2시간 동안 방치하였다. 4회 세척한 다음 100㎕씩의 Streptavidin-HRP conjugate를 각 well에 가하여 상온에서 30분 동안 방치하였다. 다시 4회 세척한 후 chromogen 100㎕를 가하여 암실에서 30분간 반응시킨 다음 100㎕씩의 stop solution을 첨가하였다. 발색 정도는 microplate reader (Spectramax 340; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-2의 희석농도와 흡광도로 표준 방정식을 구

한 후 배양 상층액 내의 IL-2 농도를 계산하였다.

6. 자료의 분석 및 통계처리

모든 자료는 평균±표준오차로 표시하였다. 통계분석은 SPSS 8.0 프로그램을 이용하여 일요인 분산분석을 시행하였고 다중비교는 Tukey의 방법을 이용하였다. 모든 경우에 p값 0.05 이하를 통계적으로 유의한 수준으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 1회의 출혈이 면역기능에 미치는 영향

가. 출혈량에 따른 말초혈액의 변화

출혈을 유발하지 않은 대조군에서 말초혈의 헤마토크릿은 46.7±1.7 g/ dL였으며, 10% 출혈 후에는 1일째 37.8±3.2 g/ dL이었고, 20%, 30% 출혈 후에는 4일째 각각 39.3±2.4, 31.6±1.0 g/ dL까지 대조군에 비해 의미있게 감소되었다가 점차 증가하는 소견을 보였다(그림 3, A). 말초 백혈구 수는 대조군에서 11,300±1,300 / mm^3이었으며, 20% 출혈 후 2일째 20,200±2,000 / mm^3로 대조군에 비해 증가된 소견을 보였다(그림 3, B). 말초 백혈구 중 임파구 분율은 대조군에서 90.2±0.7 %였으며, 30% 출혈 후 2일째에 59.4±13.1 %로 감소하였으며(그림 3, C), 절대 임파구 수는 출혈 정도 및 시간 경과에 따라 대조군에 비해 차이를 보이지 않았다(그림 3, D).

나. 출혈량에 따른 말초 임파구 아군의 변화

유세포 분석기를 통해 각 실험군의 세포를 10,000개씩 검사하여 그 중에서 임파구 아군의 분포를 검사하였다. 대조군에서 CD3+ 세포(pan T세포)는 47.9±4.2 %, CD45RA+ 세포(B세포)는 25.9±2.1 %, CD4+ 세포(보조 T세포)는 37.3±1.2 %, CD8+ 세포(세포독성 T세포)는 22.7±1.3 %였으며 출혈 정도와 시간의 경과에 따른 차이는 관찰되지 않았다(그림 4, A, B, C). 보조 T세포와 세포독성 T세포의 비인 CD4+/ CD8+ ratio도 대조군에서는 1.79±0.15였으며 각 군 간의 차이는 관찰되지 않았다(그림 4, D).

다. 출혈량에 따른 비장세포 증식능의 변화

Con A의 자극에 대한 비장세포의 증식능을 [^{3}H]-thymidine incorporation

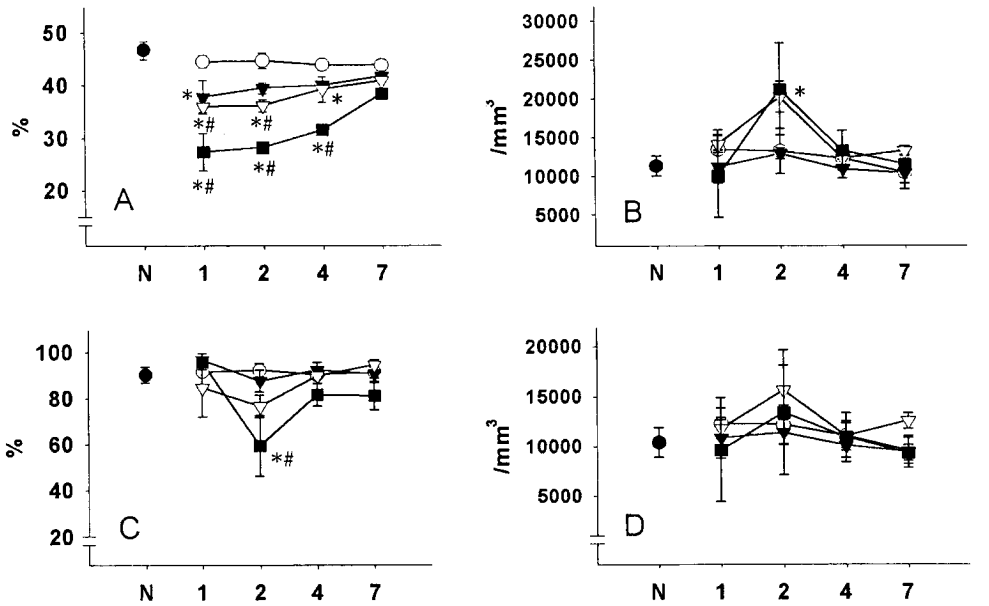

그림 3. 출혈량과 시간에 따른 말초혈액의 변화. X축은 실험군으로 N:대조군, 1: 출혈 1일 후, 2: 출혈 2일 후, 4: 출혈 4일 후, 7: 출혈 7일 후를 의미하며, A; 헤마토크릿(%), B; 백혈구 수(/mm^3), C; 임파구 분율(%), D; 절대 임파구 수(백혈구 수×임파구 분율, /mm^3)임. ●: 대조군(N), ○: 심장천자군, ▼: 10% 출혈군(7.5 ml/kg), ▽: 20% 출혈군(15 ml/kg), ■: 30% 출혈군(22.5 ml/kg). ∗; 대조군에 비하여 $p<0.05$, #; 심장천자군에 비하여 $p<0.05$, 각 군당 n=8.

법으로 측정한 결과 아무런 처치도 시행하지 않은 대조군에서는 22,820±4,869 cpm이었으나, 출혈 2일 후에는 0, 10, 20, 30% 출혈군에서 각각 20,456±2,901, 22,101±4,500, 8,433±2,172와 8,118±1,216 cpm으로 20%와 30% 출혈군에서 의미있게 감소하였다(그림 5, B). 그러나 출혈 1, 4, 7일 후에는 출혈 정도에 따른 각 군의 차이가 관찰되지 않았다(그림 5, A, C, D).

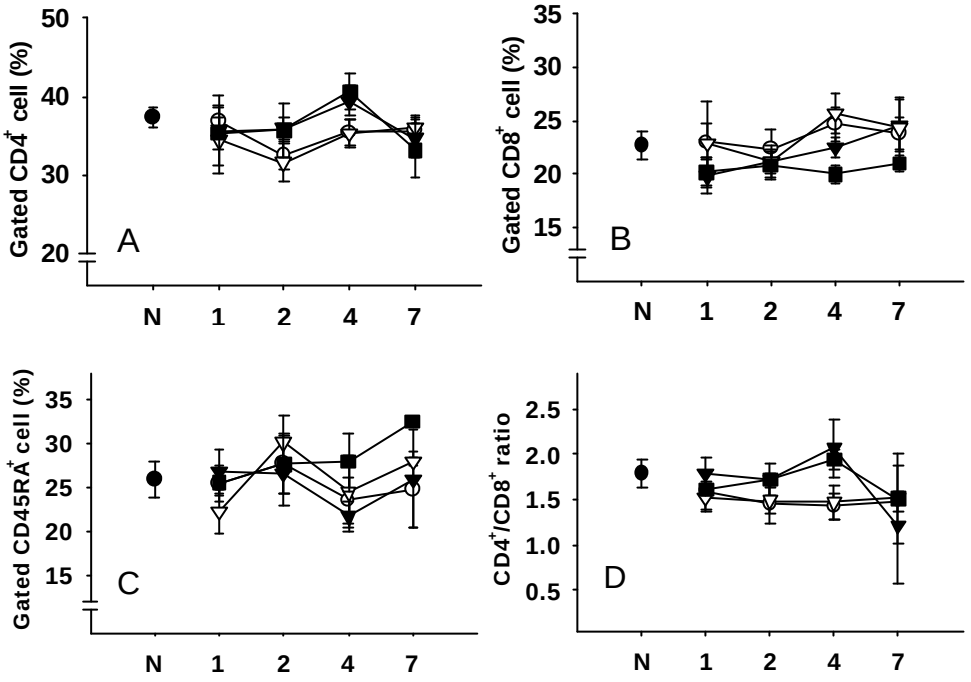

그림 4. 출혈량과 시간에 따른 말초 임파구 아군의 변화. X축은 실험군으로 N:대조군, 1: 출혈 1일 후, 2: 출혈 2일 후, 4: 출혈 4일 후, 7: 출혈 7일 후를 의미하며, A: CD4+ 세포, B: CD8+세포, C: CD45RA+세포, D: CD4+/CD8+ 비임. ●: 대조군(N), ○: 심장천자군, ▼: 10% 출혈군(7.5 ml/kg), ▽: 20% 출혈군(15 ml/kg), ■: 30% 출혈군(22.5 ml/kg). ∗: 대조군에 비하여 $p<0.05$, #: 심장천자군에 비하여 $p<0.05$, 각 군당 n=8.

10% 출혈 2일 후 각각 0%, 10%, 20%, 30% 출혈을 유발하고 2일 후 Con A 자극에 대한 비장세포 증식능을 비교하였다. 10-0%, 10-10%, 10-20% 출혈군의 증식능은 각각 7,138±1,154, 4,992±441와 2,987±224 cpm으로 10-0%군에 비해 10-20%군의 비장세포 증식능이 의미있게 감소하였다($p<0.01$, 그림 6). 10%-30% 출혈군은 두 번째 출혈 후 생존하지 못하여 실험에서 제외하였다.

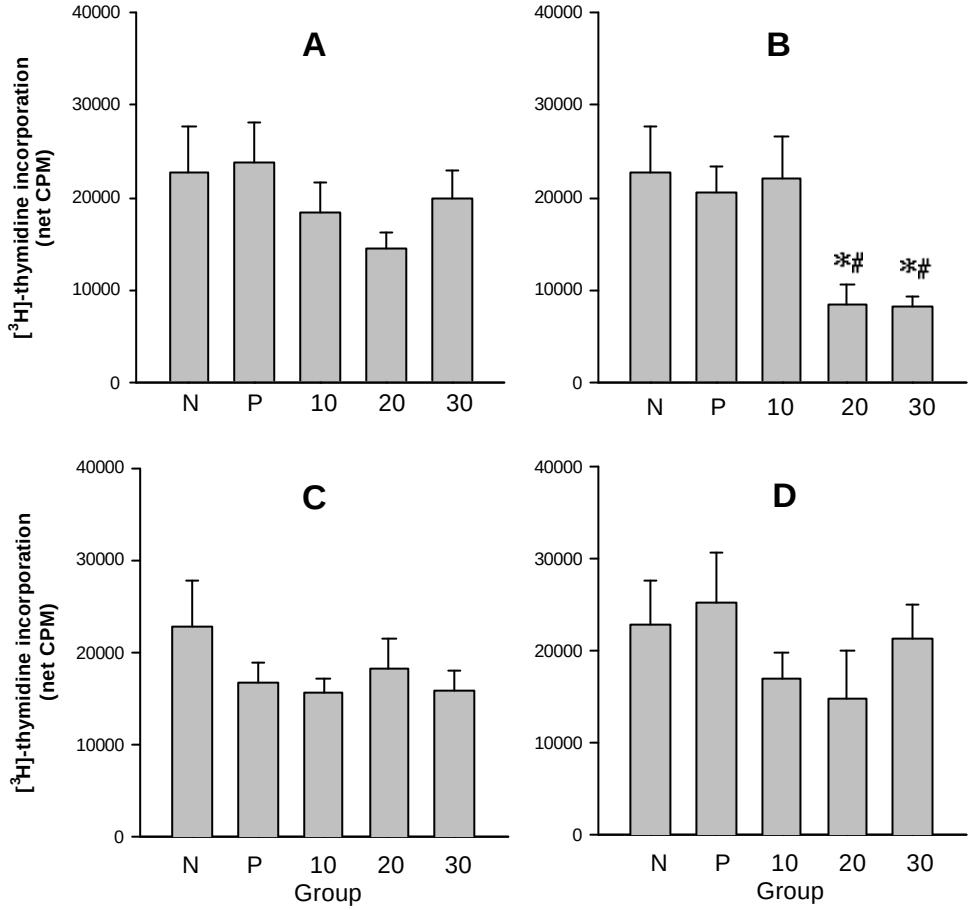

그림 6. 출혈량과 시간에 따른 비장세포 증식능. X축은 실험군으로 N: 대조군, P: 심장천자군, 10: 10% 출혈군(7.5 ml/kg), 20: 20% 출혈군(15 ml/kg), 30: 30% 출혈군(22.5 ml/kg)을 의미하며, Y축은 비장세포 증식 정도를 [^{3}H]-thymidine incorporation법으로 측정하였다. A: 출혈 1일 후, B: 출혈 2일 후, C: 출혈 4일 후, D: 출혈 7일 후. Tukey의 다중비교 상 *; N군에 비하여 $p<0.05$, #; P군에 대하여 $p<0.05$. 각 군당 n=8.

나. 10—20% 출혈에서 다양한 출혈 간격

10% 출혈 후 20% 출혈을 유발하기까지의 기간을 1, 2, 4, 7일로 다양하게 한 다음 두 번째 출혈 2일 후에 비장세포 증식능을 비교하였다. 출혈 간격 1, 2, 4, 7일군에서 비장세포 증식력은 각각 2,075±379, 2,248±557,

5,710±632, 7,300±1,608 cpm이었고, 출혈 간격 1, 2일 군과 7일 군 사이에는 의미있는 차이가 발견되었다($p<0.01$, 그림 7).

다. 10−20% 출혈군과 0−20% 및 0−30% 출혈군과의 비교

20% 출혈 2일 전에 10%의 출혈 전처치를 시행한 군의 Con A 자극 비장세포 증식능은 14,367±6,188 cpm였으며, 심장천자만 시행하고 출혈 전처치를 하지 않은채 2일 후 20% 및 30% 출혈을 유발한 흰쥐의 증식능은 12,445±1,241과 9,229±1,736 cpm으로 차이가 발견되지 않았다(그림 8, A).

한편 출혈 간격이 7일인 경우에는 10−20%, 0−20% 및 0−30% 출혈군의

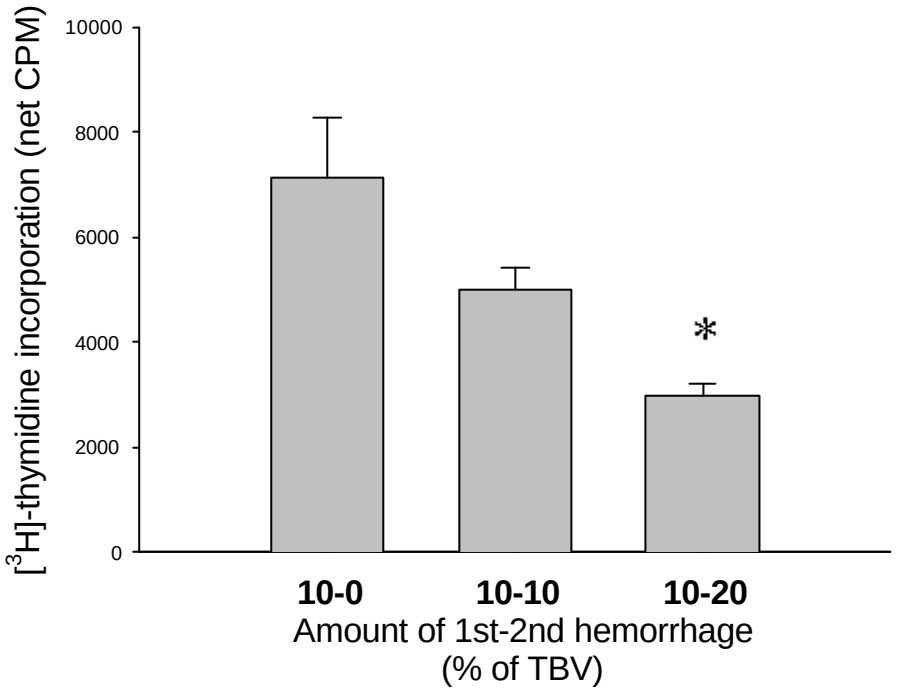

그림 6. 10% 출혈 2일 후 다양한 양의 출혈을 유발한 경우. 10% 출혈 2일 후 0, 10, 20% 출혈을 유도한 군에서 Con A 자극에 대한 비장세포 증식능을 비교하였다. 10−20% 출혈군은 10−0%군에 비해 비장세포 증식능이 의미있게 감소하였다. *: 10−0%군에 비하여 $p<0.01$, $n=8$.

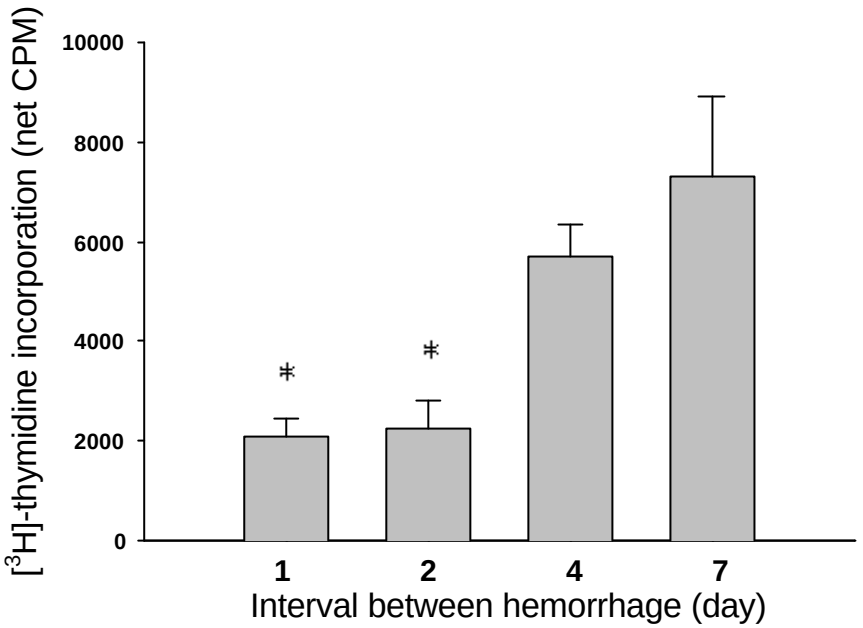

그림 7. 10-20% 출혈에서 출혈 간격을 다양하게 한 경우. 10% 출혈을 유도한 후 20% 출혈을 유도하기까지의 기간을 1, 2, 4, 7일로 다양하게 하여 비장세포 증식능의 차이를 비교하여 보았다. 출혈 간격이 7일인 군의 비장세포 증식능은 1일군이나 2일군에 비해 의미있게 증가하였다. *; 7일군에 비하여 $p<0.01$, $n=8$.

증식능이 각각 29,289±6,899, 15,775±2,009, 11,410±2,308 cpm으로 20% 출혈 전에 10% 출혈 전처치를 시행한 군이 0-20% 및 0-30% 출혈군에 비해 Con A 자극 비장세포 증식능이 의미있게 높았다($p<0.01$, 그림 8, B).

라. 10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유발하고 시간 경과를 다양하게 한 경우

10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유발하고 1, 2, 4일 후의 비장세포 증식력을 비교하였는데 각각 16,904±4,973, 3,158±2,053, 2,468±1,761 cpm으로 1일 후가 4일 후보다 의미있게 비장세포 증식력이 증가하였다($p<0.05$, 그림9, A).

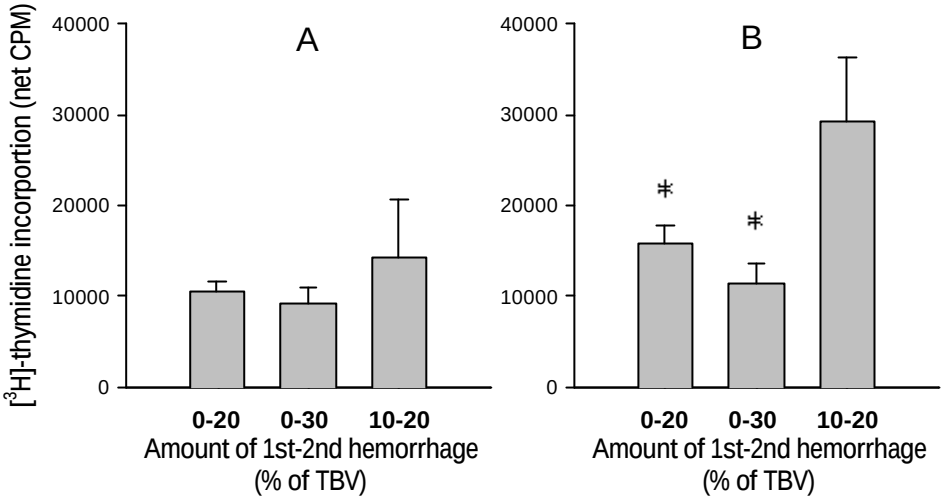

그림 8. 10-20% 출혈군과 0-20% 및 0-30% 출혈군과의 비교. 10-20% 출혈 2일 후의 Con A 자극에 대한 비장세포 증식능을 0-20% 및 0-30% 출혈군과 비교하였다. A: 출혈 간격이 2일인 경우, 각 출혈군 사이에 비장세포 증식능의 의미있는 차이가 관찰되지 않았다. B: 출혈 간격이 7일인 경우, 10-20% 출혈군은 0-20%, 0-30% 출혈군에 비해 비장세포 증식능이 의미있게 증가하였다. *: 10-20% 출혈군에 비하여 $p<0.05$, 각 군당 n=8.

마. 비장세포의 IL-2 분비에 미치는 영향

출혈 사이의 간격이 2일인 경우에는 10-20%, 0-20% 및 0-30% 출혈군의 Con A 자극 후 비장세포의 IL-2 분비량이 각각 48.6±4.5, 53.4±16.0, 72.1±9.5 pg/ml로 유의한 차이가 없었으나, 출혈 사이의 간격이 7일인 경우에는 10-20%, 0-20% 및 0-30% 군이 각각 56.8±5.0, 41.3±6.5, 84.2±11.5 pg/ml로 10-20%군과 0-30%군 간에 유의한 차이가 관찰되었다 ($p<0.05$, 그림 10). 한편 10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유발하고 1, 2, 4일 후의 비장세포의 IL-2 분비량을 측정한 결과 각각 54.7±12.4, 35.6±10.6, 24.1±5.3 pg/ml로 1일 후가 4일 후보다 의미있게 비장세포의 IL-2 분비량이 높았다($p<0.05$, 그림9, B).

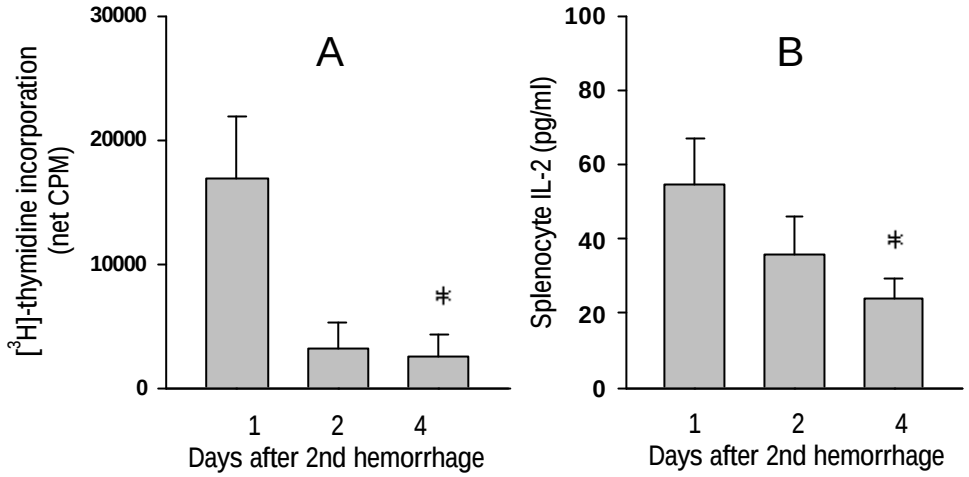

그림 9. 10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유발한 뒤 시간 경과에 따른 비장세포의 증식능과 IL-2 분비 정도. (A) Con A에 대한 비장세포 증식능 (B) 비장세포의 IL-2 분비 정도. *: 1일 군에 대하여 $p<0.05$, 각 군당 $n=8$.

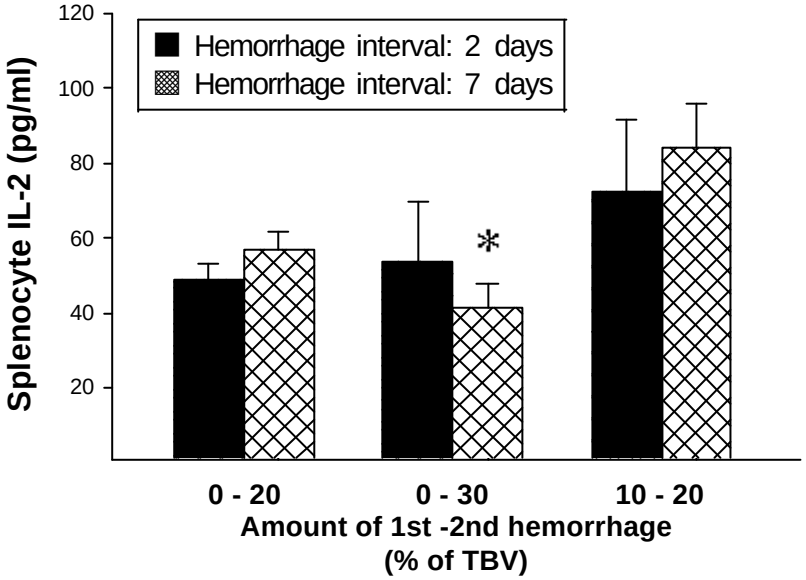

그림 10. 출혈량에 따른 비장세포의 IL-2 분비. X축은 첫번째-두번째 출혈량 (총혈액량의 %)이며 ■는 출혈간격이 2일인 경우, ▨는 출혈간격이 7일인 경우. *: 10-20% 군에 비하여 $p<0.05$, 각 군당 $n=8$.

Ⅳ. 고 찰

1920년대 외상으로 인한 사망 환자들을 분석하면서 출혈에 의한 조기 사망과 감염에 의한 후기 사망 사이에 중간 시기의 사망이 있으며, 이것이 'wound factor'에 의한 것이라고 주장한 이래로 외상이 면역 체계에 미치는 영향에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다.[19] Sauaia등은 외상으로 인한 사망을 조사하여 초기 사망의 원인은 주로 출혈이나 중추신경계의 문제로 발생하며, 외상 7일 이후의 후기 사망 원인은 MOF가 61%로 가장 많은 비율을 차지한다고 보고하였다.[34] 따라서 이 시기의 사망율을 감소시키기 위해서는 외상 후 MOF의 발생을 줄이는 것이 중요하다.

외상 후 발생되는 장기부전을 설명하기 위하여 여러 가설이 등장하였는데, Moore등은 외상 후에 초기 MOF와 후기 MOF가 발생함을 관찰하고 초기의 과염증반응기와 그 후의 면역저하기로 구분하였다.[35] 또 다른 가설은 'one-hit' 또는 'two-hit' 가설인데, 환자는 두가지 경로로 MOF에 빠질 수 있는데 첫째는 강력한 외상(one-hit)이 작용했을 때 심한 염증반응을 유발하여 MOF에 빠지게 되고, 두 번째는 외상이 그렇게 심하지 않은 경우 감염이나 수술 등과 같은 두 번째 충격(2nd-hit)에 의해 염증반응이 증폭되어 MOF로 진행될 수 있다는 것이다.[36,37] 두 번째 충격은 외상 후의 수술, 카테터에 의한 균혈증, 폐렴 등이 모두 포함되며 이차 수술이 MOF를 유발할 수 있음이 보고되었다.[38] 그러나 이 가설들은 아직 정설로 밝혀진 것은 아니며 논란이 계속되고 있다.[39,40]

출혈 후 나타나는 면역반응으로는 염증 매개물의 혈중 분비, T세포, B세포, 자연살세포, 대식세포 수의 변화, 패혈증 및 장기부전에 대한 감수성 변화 등이 알려져 있다.[41] 본 연구에서는 세포 면역을 담당하는 주요 세포인 말초 임파구와 비장세포의 숫자와 기능의 변화를 중점적으로 살펴보았다.

본 연구에서는 실험 모델로 흰쥐의 단계별 고정혈량 출혈 모델을 사용하였는데 그 중에서도 흡입마취 후에 경피적 심장천자로 일정량의 혈액을 제거하고 수액이나 혈액을 주입하지 않는 방식을 택하였다. 이 방법은 간단하고 출혈량의 조절이 쉽지만 심장천자로 인한 합병증과 심근의 조직 손상이 결과에 영향을 줄 가능성이 단점으로 제기된다. 그러나 예비 실험에서 심장천자 후 부검을 시행한 결과 혈흉이나 심낭출혈 등은 관찰되지 않았으며, 심장천자 군과 대조군 사이에 임파구 아군이나 비장세포 증식능의 차이는 관찰되지 않았다. 출혈 조작 후 수액이나 혈액을 다시 주입하지 않은 이유는 그 자체가 면역 기능에 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있기 때문이다.[42-45]

총 혈량의 10, 20 30%의 단계별 출혈이 어느 정도의 혈역학적인 영향을 주는지 알아보기 위하여 대퇴동맥에 삽관하여 혈압을 측정하면서 심장천자로 단계별 출혈을 일으킨 결과, 심장천자 시에 혈압이 급강하했다가 바늘을 뺀 후 바로 회복되었으며 총 혈액량의 10% (7.5 ml/ kg) 출혈 시에는 평균동맥압이 약 83 mmHg, 20% (15 ml/ kg)의 경우 73 mmHg, 30% (22.5 ml/ kg)의 경우 45 mmHg, 40% (30 ml/ kg)의 경우 25 mmHg 정도로 감소되었으며 40% 출혈 후에는 생존하지 못하였다.

지금까지 출혈로 인한 면역 저하는 고정 혈량 모델에서는 총 혈액량의 30% 출혈에서, 고정 혈압 모델에서는 평균동맥압 35 mmHg에서 한시간 유지한 모델에서 보고되었다.[8,46] 본 실험 모델에서는 전체 혈액량의 30% 출혈 뿐만 아니라 20%(15 ml/ kg) 출혈의 경우에도 48시간 후에 비장세포 증식능의 감소가 관찰되었다. 출혈 후 세포면역이 저하되고 회복되는 시기는 모델에 따라 차이가 있으나, 마우스에서 60분간의 출혈성 쇼크를 일으키면 2시간 후부터 비장세포의 증식능이 감소하여 1일 후 대조군의 18% 정도까지 감소하였다가 점점 증가하여 10일 후에는 98%로 회복되었다는 보고와 같이 일반적으로 출혈 직후에 시작되어 중증도에 따라 다른 회복기간을 보

이는 것으로 생각된다.[1,47] 그러나 출혈 또는 외상 후 비장세포의 증식능이 1일 후에는 증가하거나 대조군과 차이가 없다가 이후에 감소하기 시작했다고 하는 보고들도 있다.[9,48,49] 본 실험 모델에서는 출혈 2일째에만 20, 30% 출혈에서 비장세포의 증식능의 저하가 관찰되었다. 외상 후 비장세포의 증식능이 회복되는 시간 역시 외상의 정도에 따라 다르게 보고되었는데 마우스에서 출혈 또는 복부 절개 만 시행한 군은 7일과 10일 후에 비장세포의 증식능이 대조군과 차이가 없었으나 출혈과 조직손상을 동시에 시행한 군은 7일 후에도 증식능의 저하가 관찰되었다고 한다.[50] 즉, 심한 외상일수록 회복까지의 기간이 길어진다고 생각할 수 있다. 본 연구에서는 출혈량에 따른 회복 기간의 차이는 관찰되지 않았다.

한편 외상 후 말초 T세포의 수는 감소한다고 알려졌는데 다발성 외상 환자의 말초혈에서 보조 T세포의 숫자는 외상 후 21일까지 감소하였으며 단핵구의 숫자는 증가하였다고 한다.[51,52] 또한 다발성 외상 환자에서 외상 2일째 전체 임파구 수와 T세포의 수가 감소하였으며, 중증 외상 환자에서는 보조 T세포와 세포독성 T세포의 비가 의미있게 감소하였다고 하였다.[53] 이와 같이 외상 후에는 말초혈의 총 임파구 수가 감소하고, 보조 T세포와 자연살세포의 수가 감소하고 단핵구의 수가 증가하며, 보조 T세포와 세포독성 T세포의 비가 감소한다고 알려졌다.[54] 그러나 동물 실험의 경우, 흰쥐의 화상 모델에서는 비장, 흉선, 골수, 임파절 등의 장기에서 모두 임파구의 감소가 관찰되었으나 출혈 모델에서는 마우스의 30% 출혈 모델에서 비장, 골수, 임파절, 흉선 등의 장기의 임파구 분율이나 절대수는 변화하지 않았다 하며 골절을 일으킨 흰쥐에서도 비장의 보조 T, 세포독성 T, B세포와 대식세포의 수에는 변화가 없었다고 한다.[2,9,48] 즉, 외상의 종류에 따라서 장기 내의 임파구 아군의 변화에는 차이가 있는 것으로 추정된다. 출혈 모델에서 말초 임파구 아군의 수적인 변화에 대해서는 발표되지 않았는데,

본 연구에서는 각 아군에 따라 출혈군 및 시간에 따른 차이가 관찰되지 않았다. 이는 일반적으로 비침습적인 스트레스에도 말초 임파구 수 및 아군의 분포는 변화한다고 알려져 있는 것에 비하면 의외의 결과라 할 수 있다.[21] 그러나 스트레스로 말초 임파구 수 및 아군 분포가 변화하는 경우에도 스트레스가 없어진 수 시간 후에 다시 정상으로 회복되었다는 것으로 보아 출혈 후 말초 임파구 아군 분포의 변화가 첫 번째 측정 시점인 출혈 후 24시간 보다 빨리 정상으로 회복되었을 가능성이 있다.[21] 다른 해석으로는 흡입마취 하에서 짧은 기간 동안 출혈을 일으켜 큰 스트레스를 주지 않았을 가능성도 있으나 20, 30% 출혈에서 2일째 Con A 자극에 대한 비장세포의 증식능이 저하된 것으로 보아 그 가능성은 적다고 생각된다.

그 동안 반복된 출혈이 면역기능에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구가 진행되지 않았는데 Yamashita등은 일회의 10 ml/kg의 출혈은 간의 TNF-α mRNA를 증가시키지 않았지만 24시간이나 48시간 후에 같은 양의 출혈을 반복 유발하면 의미있게 증가함을 보고하였다.[55] 이는 기존의 2-hit 가설에 부합하는 결과이다. 본 연구에서는 10% 출혈 2일 후에 다시 10%의 출혈을 유발한 군은 10%－0%군에 비해 비장세포 증식능이 감소하지 않았다. 이는 "2-hit model"에서 말하는 선행된 10% 출혈로 인한 "면역저하에 취약한 시기"를 지났기 때문으로 생각된다. "2-hit model"에서 면역저하에 취약한 시기는 확실히 밝혀지지는 않았으나, 호중구(neutrophil)의 경우 외상 후 이차 충격(2nd-hit)에 취약한 시기는 6 24시간 이내로 알려져 있다.[56,57] 그런데 다발성 둔상 환자에서 수술을 외상 2 4일 후에 시행한 조기 수술군과 5 8일 후에 시행한 후기 수술군으로 나누어 비교한 연구에서는 수술 후 MOF가 조기 수술군에서 훨씬 높았다는 것으로 보아 면역저하에 취약한 시기 또한 모델에 따라 다를 것으로 생각된다.[56]

최근 Zervos등은 일련의 실험에서 2-hit 가설과 부합하지 않는 결과들을

제시하였는데, 이는 출혈이 연속되는 "2-hit"에 대해 보호작용을 할 수도 있다는 것을 의미하는 것이라 하겠다.[30,31,33] Claridge등도 마우스에서 출혈성 쇼크만 일으킨 경우에는 5일 후에 폐손상이 관찰되었으나, 출혈성 쇼크를 유발하고 5일 후에 내독소 처치 또는 개복술을 시행한 군은 오히려 폐손상이 적었다고 보고하였다.[32,59,60]

본 연구에서는 총 혈액량의 10% 출혈을 유발한 후 다양한 시간 간격을 두고 20% 출혈을 유발하였는데, 출혈 사이의 간격이 1, 2일인 경우보다 7일인 경우에 비장세포 증식능이 의미있게 높았다. 또한 10% 출혈 7일 후에 20% 출혈을 유발하면, 출혈 없이 심장천자만 시행하고 7일 후에 20%나 30% 출혈을 유발한 경우보다 비장세포 증식능이 증가되었다. 이는 10% 출혈과 20% 출혈의 간격이 2일인 경우에는 관찰되지 않았다. 즉, 출혈 사이의 간격이 7일인 경우에는 10% 출혈이 7일 후의 20% 출혈로 인한 비장세포 증식능의 저하를 억제한다고 생각할 수 있다. 이는 비장세포의 IL-2 분비 정도에서도 확인되었는데, 출혈간의 간격이 7일인 경우 10－20% 출혈이 0－30% 출혈의 경우에 비해 비장세포의 IL-2 분비가 많았다. 이러한 비장세포의 증식 및 IL-2 분비 정도는 두 번째 출혈 후 1일째에 가장 높았다.

출혈 간격이 7일인 경우에만 면역증강 효과가 나타난 것은 아직 그 기전을 정확히 알 수는 없으나 염증반응과 항염증반응의 상호작용으로 인한 것으로 추측된다. Moore는 외상에 의해 전신적 염증반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome; SIRS)이 발생되며 이의 반작용으로 보상적 항염증반응 증후군(compensatory anti-inflammatory response syndrome; CARS)이 유발되어 면역저하를 일으킨다고 설명한 바 있다.[61] 저자들은 이를 확장하여 CARS가 유발된 후 일정 기간이 지나면 다시 CARS에 대한 음성 되먹임 기전에 의해 SIRS 상태가 발생되며 두 번째 출혈이 CARS 시기에 주어지면 2-hit 가설에서와 같이 면역저하가 유발되고, CARS 다음에

오는 SIRS 시기에 주어지면 면역증강 효과가 유발된다고 생각된다(그림 11). 이를 확인하기 위해서는 호염증성 또는 항염증성 사이토카인들의 연속적인 측정이 필요할 것으로 생각된다.

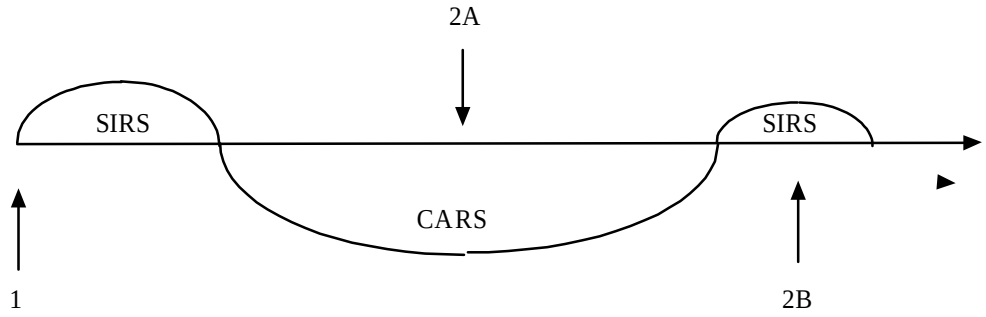

그림 11. 전처치 출혈 7일 후에 면역이 증가하는 기전을 설명하기 위한 모식도. 첫 번째 출혈(1)로 전신성 염증반응 증후군(SIRS)이 발생하며 이에 대한 음성 되먹임 기전이 작동하여 보상적 항염증반응 증후군(CARS)이 발생되어 면역저하를 일으키며 일정 기간 경과후 다시 CARS에 대한 반작용으로 SIRS가 발생된다. 두 번째 출혈이 CARS 시기에 주어지면(2A) 2-hit 가설에서와 같이 면역저하가 유발되며 SIRS 시기에 주어지면(2B) 면역증강 효과가 유발된다고 생각된다.

출혈 후 면역저하를 보고한 기존의 연구 중에서 이러한 면역의 증강효과는 알려지지 않았으나 Abraham등에 의하면 30%의 출혈을 일으킨 마우스에서 비장세포의 증식능은 2 7일까지 감소하였으나 비장세포 임파구의 수 및 아군의 분포에는 의미있는 변화가 관찰되지 않아서 출혈 후에 면역세포의 수적인 변화없이 기능의 저하가 유발된다고 결론을 내렸는데, 함께 측정한 비장세포의 IL-2 분비량은 출혈 후 2 48시간까지 감소하였다가 72시간째에는 오히려 정상보다 의미있게 증가하였고 96시간째에는 정상화됨을 보고하였다.[9] 즉, 출혈에 의한 면역기능의 저하 후에 반작용에 의한 증강현상이 나타날 수 있음을 시사하는 소견이라 할 수 있다.

본 연구의 의의는 흰쥐에서 일정한 시간 간격을 두고 출혈이 반복되었을 때 출혈에 의한 면역저하의 양상이 변화할 수 있음을 시사한 점이다.

그러나, 비장세포의 증식능과 IL-2의 분비가 증가되었다고 해서 꼭 감염에 대한 저항력이나 패혈증에 대한 생존율이 증가할 것이라고 말할 수는 없다. 또한, 이러한 현상이 사람에게서도 나타나는 현상인지, 나타난다면 어떤 시간 간격에서 나타나는지는 더 연구되어져야 할 것이다. 임상적으로 외상에 의한 출혈은 대부분 조직손상이나 골절 등을 동반하게 되고 출혈간의 기간을 조절할 수 없기 때문에, 본 연구 결과를 외상으로 인한 면역저하에 직접적으로 적용할 수는 없을 것이다. 특히 심장천자로 실혈시킨 뒤 수액을 공급하지 않은 것도 임상과 다른 부분인데, 출혈 후 수액공급을 하지 않은 것도 면역기능의 회복속도에 영향을 주었을 가능성이 있다. Knoferl등은 조직손상과 출혈성 쇼크를 유발한 마우스에서 실혈량의 4배를 Ringer's 액으로 120분 동안 공급한 군이 수액을 30분 또는 60분 동안 빨리 공급한 군에 비해서 4일 후 비장세포의 IL-3와 interferon-γ의 분비 및 비장 대식세포의 IL-1β와 IL-6의 분비가 정상으로 회복되었다고 하였다.[62] 따라서 본 연구에서 나타난 출혈 간격 7일인 경우의 면역 증강 효과가 수액소생 모델에서도 존재하는지, 존재한다면 수액 주입의 속도는 어느 정도로 해야 하는지 등이 앞으로 연구되어져야 할 것이다. 한편, 임상적으로 수술 전에 자가 수혈을 위해 헌혈을 하는 경우가 본 실험 모델에서의 소량의 출혈 전처치에 해당될 수도 있을 것이다. 수술전 자가 헌혈은 타인의 혈액을 수혈받는 것에 비해 안전하며 감염에 대한 위험이 적다고 알려져 있으나 수술 후의 면역저하에 대한 영향은 아직 연구되지 않았으며 이 또한 추후 연구가 필요한 부분이라 생각된다.[63]

V. 결 론

소량의 출혈 전처치가 대량출혈 후 면역저하에 미치는 영향을 알아보기 위해 Sprague-Dawley계 흰쥐를 이용하여 말초 임파구의 아군 분포의 변화 및 비장세포의 Con A에 대한 증식능과 IL-2 분비 정도를 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 출혈의 정도와 시간 경과에 따른 각 실험군들 사이의 말초 임파구 아군 분포에 유의한 차이는 발견되지 않았다.

2. Con A 자극에 대한 비장세포 증식능은 총 혈액량의 20%와 30% 출혈군에서 출혈 2일째에만 감소하였다.

3. 10% 출혈 후 20% 출혈을 유발하기까지의 기간이 7일인 경우에는 출혈 사이의 간격이 1일 또는 2일인 경우에 비해 비장세포의 Con A 자극에 대한 증식능이 높았다.

4. 비장세포의 증식능의 저하를 유발하는 20% 출혈 7일 전에 10% 출혈 전처치를 시행하면, 출혈 전처치 없이 20% 및 30% 출혈을 유발하는 것에 비해 Con A 자극에 의한 비장세포의 증식능이 증가하였다. 그러나 출혈 간격이 2일인 경우에는 이런 현상이 관찰되지 않았다.

5. 10% 출혈 7일 후 20% 출혈을 유도하고 1, 2, 4일 후의 Con A 자극에 대한 비장세포 증식능을 비교하였는데 1일 후가 4일 후보다 의미있게 비장세포 증식능이 높았다.

6. 출혈 간격이 7일인 경우에는 10－20% 군이 0－30% 군에 비해 IL-2 분비가 증가하였고, 10－20% 출혈 1일 후가 4일 후보다 IL-2의 분비량이 많았다.

결론적으로 면역저하를 유발하지 않는 정도의 출혈이 사전에 주어진 상태에서 다시 한번 면역저하를 일으킬 정도의 출혈을 시켰을 때 출혈간의

시간 간격에 따라 나타나는 면역반응은 달라지며, 출혈간의 간격이 7일인 경우에는 단독으로 면역저하를 유발하는 출혈에도 불구하고 오히려 면역기능의 증가가 관찰되었다. 그러나 이 효과는 두 번째 출혈 후 1일 정도의 짧은 기간에만 나타났다.

VI. 참고 문헌

1. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH. Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. Arch Surg 1987;122:62-8.
2. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, Chiao J, Kumar A, de Riesthal HF, et al. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. Ann Surg 1989;210:78-89.
3. Redmond HP, Hofmann K, Shou J, Leon P, Kelly CJ, Daly JM. Effect of laparotomy on systemic macrophage function. Surgery 1992;111: 647-55.
4. Zellweger R, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. Shock 1995a;4:149-53.
5. Meert KL, Ofenstein JP, Genyea C, Sarnaik AP, Kaplan J. Elevated transforming growth factor-β concentration correlates with posttrauma immunosuppression. J Trauma 1996;40:901-6.
6. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Williams C, Chaudry IH. Immune function is more compromised after closed bone fracture and hemorrhagic shock than hemorrhage alone. Arch Surg 1996;131:995-1000.
7. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. Crit Care Med 1998;26:1372-8.
8. Abraham E, Chang YH. Cellular and humoral bases of hemorrhage

induced depression of lymphocyte function. Crit Care Med 1986;14: 81-6.

9. Abraham E, Freitas AA, Coutinho AA. Hemorrhage in mice produces alterations in B cell repertoires. Cell Immunol 1989;122: 208-17.
10. Abraham E, Chang YH. Hemorrhage induced alterations in function and cytokine production of T cells and T cell subpopulations. Clin Exp Immunol 1992;90:497-502.
11. Zellweger R, Ayala A, Schmand JF, Morrison MH, Chaudry IH. PAF-antagonist administration after hemorrhage-resuscitation prevents splenocyte immunodepression. J Surg Res 1995b;59:366-70.
12. Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic saline enhances cellular immune function. Circ Shock 1994;42:190-6.
13. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH. Prolactin: A novel and safe immunomodulating hormone for the treatment of immunodepression following severe hemorrhage. J Surg Res 1996;63:53-8.
14. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Melatonin administration attenuates depressed immune functions after trauma-hemorrhage. J Surg Res 1996;63:256-62.
15. Angele MK, Wichmann MW, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH. Testosteron receptor blockade after hemorrhage in males. Arch Surg 1997;132:1207-14.
16. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Metoclopramide: A novel and safe immunomodulating agent for restoring the depressed macrophage immune function after hemorrhage. J Trauma

1998;44:70-7.

17. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Estradiol administration after trauma-hemorrhage improves cardiovascular and hepatocellular functions in male animals. Ann Surg 2000;232:673-9.
18. Jarrar D, Kuebler JF, Wang P, Bland KI, Chaudry IH. DHEA: A novel adjunct for the treatment of male trauma patients. Trends Mol Med 2001;7:81-5.
19. Harris BH, Gelfand JA. The immune response to trauma. Semin Pediatr Surg 1995;4:77-82.
20. Dhabhar FS, McEwen BS. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. J Immunol 1996;156:2608-15.
21. Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL. Effects of stress on immune cell distribution ― dynamics and hormonal mechanisms. J Immunol 1995;154:5511-27.
22. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. Brain Behav Immun 1997;11:286-306.
23. Mevissen M, Haussler M, Szamel M, Emmendorffer A, Thun-Battersby S, Loscher W. Complex effects of long-term 50Hz magnetic field exposure in vivo on immune functions in female Sprague-Dawley rats depend on duration of exposure. Bioelectromagnetics 1998;19:259-70.
24. Noble RL. The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usually fatal. Am J Physiol 1943;138:346.

25. Zweifach BW. The contribution of the reticuloendothelial system to the development of tolerance to experimental shock. Ann N Y Acad Sci 1960;88:203.
26. Meldrum DR, Cleveland JC, Moore EE, Patrick DA, Banerjee A, Harken AH. Adaptive and maladaptive mechanisms of cellular priming. Ann Surg 1997;226;587-98.
27. Barroso-Aranda J, Chavez-Chavez RH, Mathison JC, Suematsu M, Schmid-Schonbein GW. Circulating neutrophil kinetics during tolerance in hemorrhagic shock using bacterial lipopolysaccharide. Am J Physiol 1994;266:H415-21.
28. Fernandez ED, Flohe S, Siemers F, Nau M, Ackermann M, Ruwe M, et al. Endotoxin tolerance protects against local hepatic ischemia/ reperfusion injury in the rat. J Endotoxin Res 2000;6:321-8.
29. Ackermann M, Reuter M, Flohe S, Bahrami S, Redl H, Schade F. Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock. J Endotoxin Res 2001;7:105-12.
30. Zervos EE, Norman JG, Denham DW, Carey LC, Livingston D, Rosemurgy AS. Cytokine activation through sublethal hemorrhage is protective against early lethal endotoxic challenge. Arch Surg 1997a; 132:1216-21.
31. Zervos EE, Kramer AA, Salhab KF, Norman JG, Carey LC, Rose-murgy AS. Sublethal hemorrhage blunts the infalmmatory cytokine response to endotoxin in a rat model. J Trauma 1999;46: 145-9.
32. Claridge J, VanderPas S, Enelow R, Ley K, Young J. Prior hemo-rrhage and resuscitation does not exacerbate lipopolysaccharide-

induced acute lung injury. Surg Forum. 1999;L:138-9.

33. Zervos EE, Bloomston M, Carey LC, Salhab C, Rosemurgy AS. Conditioning to hemorrhagic shock improves survival and attenuates inflammatory cytokine gene induction in the lung, liver, and spleen of rats. Surg Forum 1997b;48:127-9.
34. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. J Trauma 1995; 38:185-93.
35. Moore F, Sauaia A, Moore E, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: A bimodal phenomenon. J Trauma 1996;40:501-12.
36. Deitch E. Multiple organ failure — pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg 1992;216:117-34.
37. Moore F, Moore E. Evolving concepts in the pathogenesis of post injury multiple organ failure. Surg Clin North Am 1995;75:257-77.
38. Waydhas C, Nast-Kolb D, Trupka A, Zettl R, Kick M, Wiesholler J, et al. Post-traumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. J Trauma 1996;40:624-31.
39. Saadia R, Lipman J. Multiple organ failure after trauma: No unifying hypothesis yet found. BMJ 1996;313:573-4.
40. Saadia R, Schein M. Multiple organ failure. How valid is the 'two-hit' model? J Accid Emerg Med 1999;16:163-7.
41. Schwacha MG, Knorferl MW, Samy TA, Ayala A, Chaudry IH. The immunological consequences of hemorrhagic shock. Crit Care & Shock 1999;2:42-64.

42. Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. J Trauma 1997;42:602-7.
43. Rhee P, Burris D, Kaufmann C, Pikoulis M, Austin B, Ling G, et al. Lactated Ringer's solution resuscitation causes neutrophil activation after hemorrhagic shock. J Trauma 1998;44:313-9.
44. Deb S, Martin B, Sun L, Ruff P, Burris D, Rich N, et al. Resuscitation with lactated Ringer's solution in rats with hemorrhagic shock induces immediate apoptosis. J Trauma 1999;46:582-9.
45. Rotstein OD. Novel strategies for immunomodulation after trauma: Revisiting hypertonic saline as a resuscitation strategy for hemorrhagic shock. J Trauma 2000;49:580-3.
46. Stephan RN, Conrad PJ, Janeway CA, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH. Decreased interleukin-2 production following simple hemorrhage. Surg Forum 1986;37:73-5.
47. Schmand JF, Ayala A, Chaudry IH. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. Crit Care Med 1994;22:1076-83.
48. Meert KL, Ofenstein JP, Genyea C, Sarnaik AP, Kaplan J. Elevated trasforming growth factor-β concentration correlates with post trauma immunosuppression. J Trauma 1996;40:901-906.
49. Mack VE, McCarter MD, Naama HA, Calvano SE, Daly JM. Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. Arch Surg 1996;131:1303-9.
50. Xu YX, Ayala A, Chaudry IH. Prolonged immunodepression after

trauma and hemorrhagic shock. J Trauma 1998;44:335-41.

51. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, et al. Alteration of monocyte function following major injury. Arch Surg 1988;123:287-92.
52. Cheadle WG, Pemberton RM, Robinson D, Livingston DH, Rodriguez JL, Polk HC Jr. Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. J Trauma 1993;35:844-9.
53. Fosse E, Trumpy JH, Skulberg A. Alterations in T helper and T suppressor lymphocyte populations after multiple injuries. Injury 1987;18;199-202.
54. Faist E, Schinkel C, Zimmer S. Update on the mechanism of immune suppression of injury and immune modulation. World J Surg 1996;20:454-9.
55. Yamashita M, Yamashita M. Responses of hepatic TNF-αmRNA to repeated hemorrhage in the conscious rat. Am J Physiol 1998;275: E27-31.
56. Pape HC, Auf'm'Kolk M, Paffrath T, Regel G, Sturm JA, Tscherne H. Primary intramedullary femur fixation in multiple trauma patients with associated lung contusion: A cause of posttraumatic ARDS. J Trauma 1993;34:540-8.
57. Botha AJ, Moore FA, Moore EE, Kim FJ, Banerjee A, Peterson VM. Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window. Surgery 1995;118:358-65.
58. Pape HC, van Griensven M, Rice J, Gansslen A, Hildebrand F, Zech S, et al. Major secondary surgery in blunt trauma patients and peri-

operative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers. J Trauma 2001;50:989-1000.

59. Claridge J, Enelow R, Young J. Hemorrhage and resuscitation induce delayed inflammation and pulmonary dysfunction in mice. J Surg Res 2000;92:206-13.
60. Claridge J, Weed A, Enelow R, Young J. Laparotomy potentiates cytokine release and impairs pulmonary function after hemorrhage and resuscitation in mice. J Trauma 2001;50:244-52.
61. Moore FA. Posttraumatic complications and changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma. Crit Care Med 1999;27: 674-675.
62. Knoferl MW, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Do different rates of fluid resuscitation adversely or beneficially influence immune responses after trauma-hemorrhage? J Trauma 1999;46;23-33.
63. Gandini G, Franchini M, Bertuzzo D, Olzer D, Crocco I, De Gironcoli M, et al. Preoperative autologous blood donation by 1073 elderly patients undergoing elective surgery: A safe and effective practice. Transfusion 1999;39:174-8.

Abstract

Effect of small hemorrhagic preconditioning on immunosuppression following massive hemorrhage in rats

Sung Pil Chung

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Cheong Soo Park)

Immunosuppression is the main cause of late death following trauma. Animal study has shown that severe hemorrhage would induce immunosuppression. Despite of several attempts to restore suppressed immune function following trauma or hemorrhage, no practical measure has been introduced into patient care. The purpose of this study is to evaluate whether adaptation mechanism could be used to modulate the immunosuppression following hemorrhage. Tolerance to hemorrhage is yet to be reported; however, endotoxin tolerance — adaptation to the repeated administration of endotoxin — has been well known. Endotoxin tolerance was recently found to have relationship to the tolerance to hemorrhagic shock. Moreover, physiologic protective effect on the hemorrhagic shock after 48 hours of pretreatment has been discovered. Based on these findings, this study was designed to evaluate whether pretreatment with small amount of hemorrhage would induce the immunomodulating effect on massive

hemorrhge that could cause immunosuppression.

The male Sprague-Dawley rats were hemorrhaged by cardiac puncture at the amount of 0, 10, 20, and 30% of total blood volume. At 1, 2, 4, and 7 days after hemorrhage, the immune responses were observed. Pretreatment with small hemorrhage (10%, not enough to cause immunosuppression) was induced 1, 2, 4, and 7 days before main hemorrhage, and immune responses were also observed. Immune functions were measured by peripheral lymphocyte subpopulation (pan T cell, T helper, T cytotoxic, B cell), Con-A stimulated proliferative capacity of and IL-2 release from splenocytes. The results were as following:

1. The distribution of peripheral lymphocyte subpopulation showed no significant differences among various amounts of hemorrhage or the time intervals after hemorrhage.

2. The Con-A stimulated proliferative capacity of splenocyte (SPC) was decreased in hemorrhage of greater than 20% of total blood volume at only 2-day interval.

3. The SPC increase was higher with 7-day interval between 10% and 20% hemorrhage than 1- or 2-day interval.

4. The SPC increase was higher when pretreatment of 10% hemorrhage was performed 7 days prior to 20% hemorrhage compared to 20% or 30% hemorrhage without pretreatment hemorrhage except cardiac puncture. This phenomenon, however, was not observed when the interval between hemorrhage was 2 days.

5. 20% hemorrhage was performed 7 days after pretreatment and the

SPC was observed at 1, 2, and 4 days after second hemorrhage. The SPC increase was higher at 1st day than 4th day after second hemorrhage.

6. The amount of IL-2 released by splenocyte was higher in 10—20% group compared to 0—30% group when hemorrhage interval was 7 days, and higher at 1st day compared to 4th day after second hemorrhage in 10—20 % group.

In conclusion, the immune response varied depending on the hemorrhage interval following pretreatment, and increased immune response was observed even after hemorrhage that, by itself, would cause immunosuppression. This effect, however, was only observed during short period of about 1 day following second hemorrhage.

Key Words: hemorrhage, immunosuppression, tolerance