

Methamphetamine이 면역장기 및 항체생성능에 미치는 영향

윤은이 · 신전수 · 박현애 · 김미영 · 선우연 · 한형미*

국립보건안전연구원 독성부

The Effect of Methamphetamine on the Immune Organs and the Antibody Production

Eun Yi YOON, Jeon Soo SHIN, Hyeon Ae PARK,
Mi Young KIM, Yearn SUNWOO and Hyung Mee HAN*

Department of Toxicology, National Institute of Safety Research, 5 Nokbundong,
Eunpyungku, Seoul 122-020, Korea

(Received February 12, 1994; accepted March 23, 1994)

Abstract—BALB/c mice were intraperitoneally injected with methamphetamine (5 mg/kg) to observe the effect of methamphetamine on the immune system. Body weights were decreased in both acutely treated group (twice for 2 weeks with 7 days interval) and subchronically treated group (daily injection for 14 days). The relative spleen weights and the numbers of splenocytes were unexpectedly increased ($p < 0.05$) in acutely treated group, but subchronically treated group showed the trend of decrease without significance. But there was no significant effect on antibody formation to hen egg lysozyme which was immunized during the treatment of methamphetamine and on plaque forming cell number. The relative thymus weights of both groups were significantly decreased by the treatment of methamphetamine (acutely treated group, $p < 0.05$; subchronically treated group, $p < 0.01$). These results suggest that the effect of methamphetamine on the immune system may be caused by thymic dysfunction.

Keywords □ methamphetamine, antibody formation.

Cocaine, morphine은 중추신경흥분제로써 면역계에 대한 연구가 비교적 활발히 이루어져 cocaine의 경우 interferon- γ , interleukin-4같은 lymphokine생성저하(Francesco 등, 1992) concanavalin A(Con A)나 lipopolysaccharide(LPS)에 대한 세포증식능의 저하 및 지연형 과민 반응 저하 등이 보고되어 있고(Watzl과 Waston, 1990), morphine의 경우 interferon, IL-2 생성저하, 탐색세포의 탐색능저하, 자연살세포 활성저하 및 Con A에 대한 세포증식능의 저하 등이 보고되고 있다(Jessop과 Taplits 등, 1991; Pruett 등, 1992). Amphetamine계 약물도 중추신경흥분제로써 스트레스자극에 대한 행동반응 및 corticosterone의 분비를 증가시키는 것으로 알려지고 있다(Monjan과 Collector 등, 1977; Keller 등, 1988; Weiss 등, 1989; Khansari 등, 1990). 스트레스 자극등은 숙주 저항력의 감소 특히 세포성 면역능 저하를 가져오며(Ga-

rabal 등; 1991), 또 스트레스 자극에 의해 과도하게 분비되는 corticosterone 등의 내분비계의 호르몬 이상도 면역 저하를 초래하는 것으로 알려지고 있다(Watzl과 Waston, 1990). 이러한 면역계의 이상이 중추신경흥분제의 직접적인 작용에 기인하는지 혹은 중추신경흥분제로 인한 내분비계 호르몬 이상에 의한 간접적인 작용인지는 확실하지 않다(Watzl과 Waston, 1990). 그러나 우리나라에서 훨씬 더 남용되고 있는 methamphetamine이 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 드문 실정이다. 본 실험에서는 methamphetamine이 면역계에 미치는 영향에 관하여 알아 보고자 methamphetamine 투여 후 면역장기 및 항체 생성능에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법

플라크 형성 세포 측정

실험동물 : 웅성 BALB/c 마우스(체중 25~30 g)를 국

* To whom correspondence should be addressed.

립보전안전연구원(서울)에서 공급받아 사용하였고 실험군을 두 군으로 나누어 7일 동안 methamphetamine 5 mg/kg을 매일 피하투여 하였으며 대조군은 생리식염수를 투여하였다. 투여 4일째 면양 적혈구(sRBC, 5×10^8 세포/ml) 0.1 ml을 마우스 복강내 투여하여 면역적혈구에 대한 항체생성능의 변화를 플라크 형성 세포수(plaque forming cell)측정법으로 관찰하였다.

플라크 형성 세포 측정 : 마우스를 경추탈구법으로 희생시킨 후 비장을 적출하여 비장을 부드럽게 압착시켜 비장세포를 유출시킨 후 Earle's balanced salt solution (EBSS)으로 1,500 rpm에서 10분간 3회 세척한 후 1×10^6 세포/ml 밀도로 세포수를 조정하였다. DEAE dextran (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)이 들어있는 0.4% agar(Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)를 제조하여 47°C 항온수조에 넣고 50 μ 를 취하여 비장세포 100 μ (1×10^5 세포), 생리식염수로 3회 세척하여 얻은 면양적혈구 25 μ 및 guinea pig에서 얻은 보체(Sigma Chemical Co.) 25 μ 와 섞은 후 petri dish에 넣고 24×40 mm cover glass로 살짝 덮었다. 이때 기포가 생기지 않고 고르게 퍼지도록 petri dish를 가볍게 두드리고 agarose를 굳힌 후 petri dish 뚜껑을 덮어 humidified 5% CO₂ 배양기에서 37°C, 3시간 배양시켰다. 배양 후 형성된 플라크 수를 세어 1×10^6 비장세포의 단위로 계산하였고 각 실험은 2번 시행하여 그 평균값을 사용하였다.

면역장기무게 및 항체가 변화 측정

실험동물 : 양성 BALB/c마우스(25~30 g)를 3군으로 나누어 급성 투여군은 methamphetamine 5 mg/kg을 1일째와 8일째에 걸쳐 총 2회 복강내 투여하고 나머지 날짜는 생리식염수를 투여하였으며, 만성(subchronic)투여군은 동량을 매일 복강내로 14일간 투여하였다. Methamphetamine투여에 따른 항체가의 변화를 측정하기 위하여 hen egg white lysozyme(HEL, Boehringer-mannheim GmbH, Germany)을 항원으로 사용하여 1일째와

8일째에 마우스당 2 mg/0.1 ml씩 복강내 감작시켰다. Methamphetamine투여와 HEL감작이 같은 날에 행해질 경우 methamphetamine을 투여한 30분 후에 HEL을 감작시켰다. 항원만 감작시킨 양성 대조군은 1주 간격으로 총 2회 HEL을 감작시켰다(Fig. 1).

면역장기의 무게 측정 및 항체가 측정 : 마우스를 실험 15일째 에테르마취시켜 체중을 측정하고 심장 채혈한 후 비장 및 흉선을 적출하여 각각 무게를 측정하였다. 비장세포는 위에서 기술한 방법으로 얻었고 증류수를 이용한 hypotonic shock방법으로 적혈구를 제거한 후 RPMI 1640배지(Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)로 세번 세척하였다. 비장세포의 일부는 automatic cytochemical counter(Techicon Instrument Co., Tarrytown, NY, USA)이용하여 세포수를 측정하는데 사용하였고 나머지 비장세포는 10% 우태아 혈청(Gibco Laboratories, USA), 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 μ g/ml), L-glutamine(2 mM)이 함유된 RPMI 1640 배지에 1×10^6 세포/ml로 밀도를 조정하였다. 감작 항원 HEL에 대한 마우스 항체가는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 측정하였다(Francesco 등, 1992). HEL을 carbonate buffer(pH 9.6)에 50 μ g/ml로 만들어 밀이 평편한 EIA plate(Costar Co., Cambridge, MA, USA)의 각 well당 100 μ 씩 가한 후 37°C 에서 하룻밤 방치하여 부착시켰다. 다음날 plate를 0.05% tween 20이 함유된 인산 완충식염수(PBST, pH 7.4)로 세척한 후 5%(vol/vol)의 normal goat serum(Gibco Laboratories.)이 함유된 PBST를 각 well당 200 μ 씩 넣은 후 1시간 동안 37°C 에서 방치하였다. 혈청은 1 : 100으로 희석한 후 100 μ 씩 가하고 37°C 에서 90분간 방치하였고 그 이후 plate를 PBST로 세척한 후 peroxidase가 부착된 goat anti-mouse IgG(Sigma Chemical Co.)를 1 : 500으로 희석하여 100 μ 씩 가한 후 37°C 에서 90분간 반응시켰다. Plate를 다시 세척한 후 o-phenylenediamine

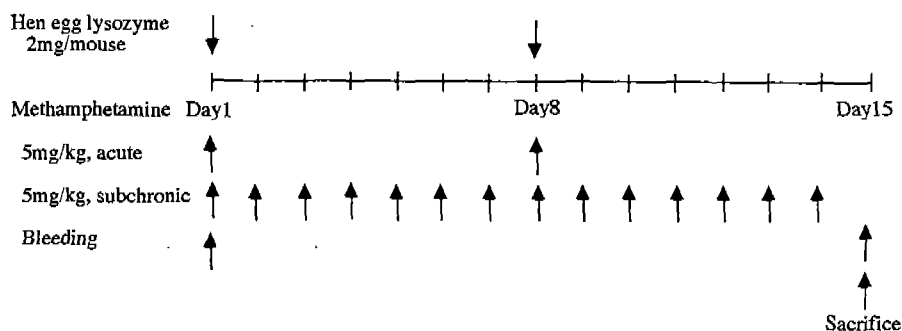


Fig 1. Treatment schedule of methamphetamine and hen egg lysozyme in BALB/c mice. BALB/c mice were intraperitoneally immunized with hen egg lysozyme (2 mg/mouse) and injected with acute methamphetamine treatment (5 mg/kg/day on day 1 and day 8) and with subchronic drug treatment (5 mg/kg/day for 2 weeks). Control mice were injected with normal saline instead of methamphetamine. Blood was collected before and after drug administration by tail-bleeding.

Table I. Effect of methamphetamine administration on body weight

Treatment group	No. of mice	Body weight at t=0 (g)*	Final body weight (g)	% change of body weight**
Control	9	26.21± 2.13***	30.37± 2.39	117.17± 17.57
Methamphetamine				
5 mg/kg, acute	6	29.97± 1.78	30.45± 1.47	101.68± 1.57 ⁺
5 mg/kg, subchronic	6	29.30± 1.55	22.30± 1.12	76.16± 2.51 ⁺⁺

Treatment schedule of methamphetamine is described in the legend of Fig. 1.

* Body weight was measured just before the treatment.

**% change of body weight= (final body weight/body weight at t=0)×100.

***Mean± S.E.

⁺p<0.05 vs. control group.

⁺⁺p<0.01 vs. control group.

(H₂O₂기질)용액을 100 μl 가하고 상온에서 15분간 발색시킨 후 2.5 N H₂SO₄용액을 50 μl 가하여 반응을 정지시키고 발색정도는 490 nm의 파장에서 ELISA reader (Molecular Devices Co., Menlo Park, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 각 혈청은 duplicate로 검사하였고 이 평균값과 항원이 결합되지 않은 대조 well의 평균값의 차이값을 결과 분석에 이용하였다.

통계처리

모든 실험결과를 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고 p<0.05 혹은 p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

Methamphetamine 투여가 마우스 체중변화에 미치는 영향

Methamphetamine, 5 mg/kg을 1주일 간격으로 2회 투여한 급성투여군과 14일간 매일 투여한 만성투여군의 체중을 관찰한 결과 HEL로 투여한 대조군의 체중변화는 117.17± 17.57%이었으나 급성투여군은 101.68± 1.57%(p<0.05), 만성투여군은 76.16± 2.51%(p<0.01)로 변화하여 대조군 보다 유의있게 체중증가율이 감소하였으며(Table I) 이 변화는 대조군의 평균 체중 증가율을 100으로 기준하였을 때 경우 급성투여군의 체중변화는 86.8, 만성투여군의 체중 변화는 65.0에 해당하였다.

Methamphetamine 투여가 마우스 면역장기에 미치는 영향

Methamphetamine이 면역장기에 미치는 영향은 비장의 무게, 비장세포수, 흉선무게의 변화로 관찰하였다. 비장의 무게는 급성 투여군은 0.171± 0.064 g으로 대조군(0.120± 0.008)보다 유의있게(p<0.05) 증가하였고 만성 투여군은 0.098± 0.032 g으로 대조군보다 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의는 없었다. 비장 무게의 변화는 체중을 고려한 상대적 비장 무게[relative spleen weight=spleen weight(mg)÷body weight(g)]로 관찰 하였다. 급성 투여군은 5.61± 2.07로 대조군(3.97± 0.35)에

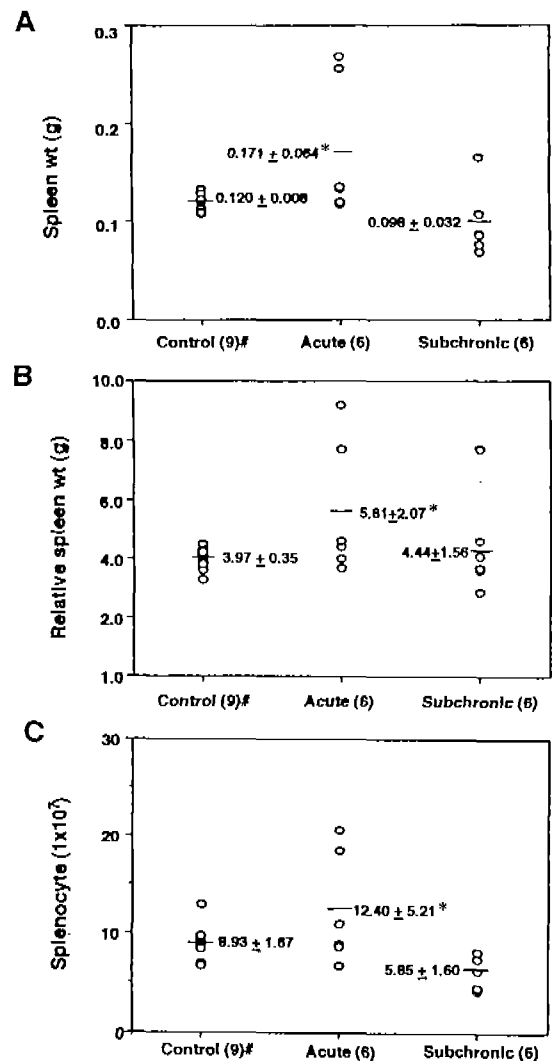


Fig 2. Effects of methamphetamine on spleen weight and relative spleen weight and cell number. Treatment schedule of methamphetamine is described in the legend of Fig. 1. A, final spleen weight. B, relative spleen weight which is calculated from spleen weight (mg) divided by whole body weight (g). C, Numbers of total splenocytes. Horizontal bar indicates a value of mean. Each data is presented as a mean± S.E. *p<0.05 vs. control group, #No. of mice.

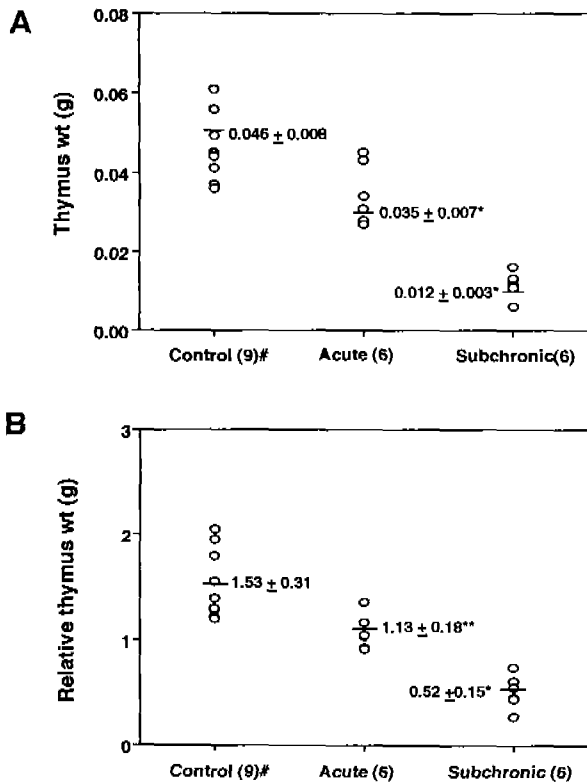


Fig 3. Effects of methamphetamine on thymus weight and relative thymus weight. Treatment schedule of methamphetamine is described in the legend of Fig. 1. A, final thymus weight. B, relative thymus weight is calculated from thymus weight (mg) divided by whole body weight (g). Horizontal bar indicates a value of mean. Each data is presented as a mean ± S.E. * $p < 0.01$ vs. control group, ** $p < 0.05$ vs. control group, #No. of mice.

비하여 유의있게($p < 0.05$) 증가하였으며, 비장세포수도 $[(12.40 \pm 5.21) \times 10^7]$ 로 대조군 $[(8.93 \pm 1.67) \times 10^7]$ 에 비하여 유의있게($p < 0.05$) 증가하였다. 만성투여군의 상대적 비장 무게는 4.44 ± 1.56 로써 대조군 (3.97 ± 0.35) 보다 약간 증가하였으나 통계적 의의가 없었으며 비장세포수도 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 의의는 없었다(Fig. 2). 반면 상대적 흉선무게[relative thymus weight = thymus weight(mg) ÷ body weight(g)]는 급성 투여군 (1.13 ± 0.18) 과 만성 투여군 (0.52 ± 0.15) 모두 대조군 (1.53 ± 0.31) 에 비하여 유의있게(급성 투여군, $p < 0.05$; 만성 투여군, $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 3).

Methamphetamine 투여가 항체형성능에 미치는 영향

Methamphetamine, 5 mg/kg을 7일간 투여하고 sRBC로 면역한 후 직접플라크 용혈법으로 sRBC에 대한 항체형성세포수(antibody forming cell)의 변화를 예비실험으로 관찰한 결과 methamphetamine을 투여한 군 $(3,771 \pm 437)$ 과 대조군 $(3,879 \pm 259)$ 사이에 통계적인 항체형성 세포수의 차이는 없었다(Table II). 항체 생성량의 변화를

Table II. Effect of methamphetamine administration on the antibody forming response of splenocytes in BALB/c mice

Treatment	No. of mice	AFC* ($/1 \times 10^6$ splenocytes)
Control	6	$3,879 \pm 259^{**}$
Methamphetamine	5	$3,711 \pm 437$

Five BALB/c mice of methamphetamine-treated group were subcutaneously injected with methamphetamine (5 mg/kg/day for 7 days), and six control mice were injected with normal saline. sRBC (5×10^8 cells/ml, 0.1 ml) were intraperitoneally injected on the fourth day and plaque forming cell assay was done on the eighth day.

*Antibody forming cells per 1×10^6 splenocytes.

**Mean ± S.E.

Table III. Effect of methamphetamine administration on the humoral response to HEL in BALB/c mice

Treatment	No. of mice	A_{490nm}^*
Control	9	$1.407 \pm 0.957^{**}$
Methamphetamine		
5 mg/kg, scute	6	1.685 ± 0.500
5 mg/kg, subchronic	6	2.116 ± 0.410

Treatment schedule of methamphetamine is described in the legend of Fig. 1. Hen egg lysozyme (2 mg/mouse) was intraperitoneally treated on the day 1 and day 8. The ELISA was performed on the 15th day with nonpooled sera.

*Absorbance at 490 nm by ELISA.

**Mean ± S.E.

더 정확히 관찰하기 위해 T세포 의존 항원으로 알려진 HEL(Allen 등, 1987)을 1주일간격으로 두차례 면역하면서 methamphetamine을 급성과 만성으로 투여하였다(Fig. 1). 급성투여군은 HEL투여와 동일한 날에 methamphetamine을 투여하였고 만성투여군은 HEL 감작기간인 14일 동안 매일 투여하였다. HEL에 대한 흡광도의 변화를 ELISA 측정한 결과 급성 투여군 (1.685 ± 0.500) 과 만성 투여군 (2.116 ± 0.410) 모두 대조군 (1.407 ± 0.957) 과 비교하여 유의있는 변화를 관찰할 수 없었다(Table III).

고 찰

Methamphetamine이 체액성면역에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 sRBC에 대한 항체형성 세포수를 플라크형성법으로 측정한 결과 대조군과 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 항체 생성량의 변화를 관찰하기 위하여 마우스를 다시 급성 투여군과 만성투여군으로 나누어 HEL로 면역시킨 후 HEL에 대한 항체 생성변화를 통하여 항체 생성능에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이를 관찰할 수 없어 methamphetamine이 항체 생성에 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 이 결과는 오랫동안 약물을 남용한 경우 혈중 immunoglobulin치가 정상인보다 증가하고, 또한 시험관

내에서 말초혈액 림프구를 cocaine과 T세포 의존성 mitogen인 pokeweed mitogen(PWM)으로 자극하였을 때 생성되는 immunoglobulin 양은 PWM 단독 투여군과 큰 차이가 없는 결과와 유사하였다(Martinez과 Watson, 1990). Francesco 등(1992)은 BALB/c 마우스에 HEL 투여하기 30분전 혹은 12시간 후에 cocaine을 처치하고 1주일 후에 HEL에 대한 항체가를 측정하였을 경우 의미있는 항체가 감소를 관찰할 수 있었으나 7일간 연속 cocaine을 처치하였을 경우에는 대조군과 차이를 관찰할 수 없어 cocaine이 항체형성의 inductive phase에 영향을 주는 것으로 보고 하였다. 그러나 본 실험에서 cocaine의 작용기전과는 달리 methamphetamine을 급성으로 투여군과 만성으로 투여한 군에서 항체 생성에 큰 영향이 없는 이유는 좀 더 연구되어야 하리라 생각된다.

Methamphetamine을 급성 혹은 만성 투여군 모두에서 체중이 유의있게 감소하는 현상으로 보아 이 약물은 다른 중추신경 흥분제와 마찬가지로 식욕저하에 의한 현상으로 생각되며 특히 만성으로 약물을 투여한 군에서 체중 감소가 더욱 심하게 나타나는 것으로 보아 습관적인 약물오용 및 남용자들의 신체균형은 상당한 영향을 받으리라 생각된다. 상대적 비장 무게와 비장세포수의 경우 급성 투여군은 대조군보다 증가하여 기대와 다른 효과를 나타내었다. 이 현상은 급성 투여군 6마리 마우스 중 2마리에서 비장비대(평균비장무게보다 2배 이상 증가)에 의한 현상과 관련이 있다. 이와 같은 비장비대와 비장세포수가 증가하는 원인은 아직 알 수 없으나, 이 약물이 조절 기관인 골수세포와 세포주기 및 세포증식에 미치는 영향에 대하여 관찰이 필요하다. 만성투여군에서도 비장의 무게는 6마리 마우스 중 1마리에서 비장비대가 있었다. 이 군의 상대적 비장 무게와 비장세포수의 평균 변화는 감소하는 경향을 보였지만 통계적 의의는 없었다. 이는 methamphetamine에 대한 내성이 생긴 영향 때문이라고 생각된다(Johanson과 Fischman, 1989). 흥선의 무게는 급성 혹은 만성 투여군 모두에서 대조군에 비하여 유의있게 감소하였다. Amphetamine을 투여한 마우스의 T림프구 증식반응과 *Listeria monocytogenes*에 대한 저항력이 떨어지는 결과로 볼 때(Garabal 등, 1991) methamphetamine 투여에 따른 면역기능의 장애는 흥선의 위축과 관련이 있을 것으로 생각된다. 위 실험에 사용된 HEL 항원은 T세포 의존성 항원으로(Allen 등, 1987)이 항원에 대한 항체형성이 차이가 없는 것은 Th₂세포의 기능보다도 Th₁세포의 기능에 이상이 있을 것으로 생각

되며(Lee 등, 1990) 그 기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

- Allen, P. M., Babbitt, B. P. and Unanue, E. R. (1987). T-cell recognition of lysozyme: the biochemical basis of presentation. *Immunol. Rev.* **98**, 171-187.
- Francesco, P. D., Marini, S., Pica, F., Favalli, C., Tubro, E. and Garaci, E. (1992). *In vivo* cocaine administration influences lymphokine production and humoral immune response. *Immunol. Res.* **11**, 74-79.
- Garabal, M. F., Balboa, J. L., Castano, M. T., Llovo, J. B., Fernanaderal, J. C. and Belmonte, A. (1991). Effects of amphetamine on T-cell immune response in mice. *Life Sciences* **49**, PL107-PL112.
- Lee, J. D., Swisher, S. G., Minehart, E. H., McBride, W. H. and Economou, J. S. (1990). IL-4 downregulates IL-6 production in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leuk Biol.* **47**, 475-479.
- Jessop, J. J. and Taplits, M. S. (1991). Effect of high doses of morphine on ConA induced lymphokine production *in vitro*. *Immunopharmacology*. **22**, 175-184.
- Johanson, C. E. and Fischman, M. W. (1989). The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol. Rev.* **11**, 3-52.
- Keller, S. E., Schleifer, S. J., Liotta, A. S., Bond, R. N., Farhoody, N. and Sten, M. (1988). Stress-induced alterations of immunity in hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 9297-9301.
- Khansari, D. N., Murgo, A. J. and Faith, R. E. (1990). Effects of stress on the immune system. *Immunology Today*. **11**(5), 170-175.
- Martinez, F. and Watson, R. R. (1990). Effects of cocaine and morphine on IgG production by human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Life Sciences*. **47**, PL 59-PL 64.
- Monjan, A. A. and Collector, M. I. (1977). Stress-induced modulation of the immune response. *Science*. **196**, 307-308.
- Pruett, S. B., Han, Y. C. and Fuchs, B. A. (1992). Morphine suppresses primary humoral immune responses by a predominantly indirect mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**(3), 923-928.
- Watzl, B. and Weston, R. R. (1990) Immunomodulation by cocaine - a neuroendocrine mediated response. *Life Sciences*. **46**, 1319-1329.
- Weiss, J. M., Sundar, D. K., Becker, K. J. and Cierpial, M. K. (1989). Behavioral and neural influences on cellular immune responses: Effects of stress and interleukin-1. *J. Clin. Psychiatry*, **50**:5(Suppl), 43-53.