말초신경 손상 통증모델에서 쥐 NK 세포의 세포독성 변화

가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원, *성모자애병원, †성모병원 마취통증의학과

강유진 · 송호경* · 전진영† · 유주현*

Alterations in NK Cell Cytotoxicity Induced by Peripheral Nerve Injury in Mice

You Jin Kang, M.D., Ho-Kyung Song, M.D.*, Jin Young Chon, M.D.†, and Joo Hyun You, M.D.*

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, St. Vincent's Hospital, Suwon, *Our Lady of Mercy Hospital, Incheon, †St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Chronic pain is often associated with changes in the immune responses, which highlights the need for the aggressive pain control to obtain a better prognosis. This study examined splenic NK cell cytotoxicity in an attempt to assess the possible changes in the immune function under chronic neuropathic pain after a partial transection of the sciatic nerve.

Methods: After confirming tactile allodynia in response to the von Frey filament, a modified lactate dehydrogenase (LDH) release assay was used to determine the cytotoxic activity of splenic NK cells on the YAC-1 cell line in C3H/HeN (H-2k) mice (n = 6). NK cells as effector cells were mixed with YAC-1 cells as target cells ($1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$), resulting in an effector-target ratio of 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100 in the culture medium.

Results: At 1 and 2 weeks after the nerve injury, all the subjects showed significant mechanical sensitivity compared with those observed before surgery. The percentage of NK cell cytotoxicity of the neuropathic mice increased significantly 1 week after the nerve injury but decreased within 2 weeks compared with the normal mice.

Conclusions: In terms of the altered NK cell cytotoxicity, neuropathic pain can cause changes in the normal performance of the immune function. (Korean J Anesthesiol 2007; 52: 219 ~ 23)

Key Words: immune system, immunologic cytotoxicity test, neuropathy, NK cell, pain.

서 론

말초신경의 손상은 가끔 몇 가지의 특징적인 임상증후를 동반하면서 비정상적인 통증을 보이고 또한 그 치료 과정에서도 많은 문제를 해결해야만 하는 신경병증성 통증을 초래하기도 한다. 이 통증의 기전은 척수와 그 상위중추의 생화학적인 변화가 원인이 되는 것으로 시상하부, 뇌하수체, 부신, 교감 신경의 활성화로 인한 여러 가지 신체적인 변화를 일으킨다.^{1,2)} 특히 면역학적인 견지에서 림프구의 증식, 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)에 영향을 주어 면역체계 혹은 그 기능에 변화를 초래한다고 한다.^{3,4)} 그러

므로 이러한 상태에서 환자는 상처의 치유나 이차 감염에 취약해지며, 악성종양의 전이를 방지하는 데 있어 불리해 질수 밖에 없다.

최근 만성통증의 기전을 이해하기 위한 동물 실험 모델로 쥐의 좌골신경을 결찰하여 만든 신경병증성 통증모델이 많이 이용되어 왔다.^{5,6)} 그러나 신경 결찰 시 사용한 이물질에 대한 염증반응은 그 자체가 통증을 일으키는 단점이 있어^{7,8)} 저자들은 염증반응이 적으면서도 이질통 등 신경병증성 통증의 특징은 보이는 좌골신경 부분절제(partial transection of sciatic nerve) 동물모델을 이용하는 방법으로 일차적인 세포면역을 담당하는 NK세포의 활성을 평가하여 만성 통증 시 면역기능의 변화에 대하여 알아 보았다.

대상 및 방법

신경병증성 통증 모델 제작

본 연구는 가톨릭 중앙의료원 임상연구 윤리 위원회의 사전심사를 받고 연구 관리규정을 준수하였다. 실험동물로

논문접수일 : 2006년 7월 3일

책임저자 : 송호경, 인천시 부평구 부평6동 665

성모자애병원 마취통증의학과, 우편번호: 403-016

Tel: 032-510-5518, Fax: 032-518-2718

E-mail: genovia@olmh.cuk.ac.kr

이 논문은 성모자애병원 연구비지원에 의해 연구되었음.

는 체중 20—25 gm 내외의 C3H/HeN (H-2k) mice (Charles River Japan Inc, Tokyo, Japan) 40마리를 사용하였다. 실험 전 최소 1주일 동안 공기 정화기능과 에어컨이 조절되는 환경에 적응시키면서 소독된 bedding (GLP bedding, B&K, USA)이 깔린 polysulfone으로 제작된 우리(Daejeong E&C, Korea)에서 방사선 조사된 실험동물 먹이 A04-10 (UVR Quality Assurance, Orge, France)로 사육하였다. 동물실은 온도 23°C 상대습도 50—55%로 유지하고 12시간 간격으로 명암이 조절되게 하였다.

신경병증성 모델은 에테르로 쥐를 마취시킨 후 좌측 뒷다리 피부의 털을 깎고 povidone iodine 용액과 isopropyl alcohol로 소독하였다. 대퇴 원위부의 sciatic notch 부근에 피부절개를 하고, 피하조직을 분리시키면서 대퇴 이두박근을 노출시켜 그 근막으로부터 좌골신경을 분리하여 내측 쪽 일부를 11번 수술용 메스를 이용하여 절제하였다.⁹⁾

Mechanical sensitivity의 검사는 기계적 자극에 대한 회피반응(withdrawal response)을 관찰하였고 일단 동물은 바닥이 망으로 만들어진 안이 들여다보이는 플라스틱 우리에 옮겨 안정되기를 기다린 후 자극은 von Frey 필라멘트를 사용하였으며 강도가 약한 것부터 강한 순서로 회피반응이 나타날 때까지 필라멘트가 약간 구부러질 정도로 눌러 자극하였다. 다리나 발을 들어 올리거나 피하는 행동을 보이면 회피반응이 있는 것으로 간주하였고, 반응이 없을 경우 한 단계 높은 강도의 자극을 가하였다. 30초 간격으로 3번 실시하였고 한번에 가해진 자극은 6초간으로 하였다. 우선 기본값을 얻기 위해 신경 절제 전 한 번 반응을 측정하였고, 수술 후 1주일과 2주일에 비장을 적출하기 전 신경병증성 통증이 확실히 유발되었는지 확인하기 위해 다시 측정하였다.

NK 세포의 분리와 배양

좌골신경 부분절제 1주일과 2주일에 각 군 6 마리의 쥐를 경추 탈골로 희생시킨 다음, 70% ethanol로 배부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 멸균된 homogenizer로 비장을 균일화시킨 다음, 50 ml 시험관에 망을 올려 놓고 이를 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배양액(GibcoBRL)으로 적신 후, 균일화된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 세척하였다. 이어 적혈구를 제거하기 위해 적혈구 용해 용액과 PBS (phosphate buffered saline)를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 분리한 다음, PBS 용액으로 다시 두 번 세척하고 나머지 세포들은 LDH 분석 전에 Trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인한 후, 배양하였다. 조직배양액은 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, NY, USA), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배양액(RPMI 1640, GibcoBRL)을 이용하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양

기에서 배양하였다.

NK 세포의 분리는 magnetic cell sorting을 이용한 NK cell isolation kit (MACS: Miltenyi Biotec, Germany)를 이용하였다. 이는 NK 세포가 아닌 비NK 세포들을 항체로 표지하여 이들이 자기장의 관을 통과하는 과정에서 흡착되면서 제거되도록 하는 방법으로 결국 통과된 NK세포만이 모아진다. 이렇게 모인 NK 세포의 순수도(purity)는 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 검사하였다.

NK 세포의 세포독성

NK cell의 세포독성 능력을 보는 방법으로는 NK세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포(NK-sensitive cell line)를 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법(modified lactate dehydrogenase [LDH] release assay)를 이용하였다. 96-hole well U-bottom culture plate(Corning Glass Works, Corning, USA)에 $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ 가 되도록 YAC-1 세포수를 조정하고 NK 세포와 같이 배양했는데, NK세포수는 몇 가지의 다른 농도로 즉, effector-to-target 세포 비가 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100이 되도록 세포수를 달리 하였다.¹⁰⁾ 이후 5% CO₂가 포함된 습도 90%, 37°C의 공기에서 4시간 동안 반응이 되도록 세포배양기에 두었다가 원심 분리하여 LDH가 유리된 상층액 100 μl 만을 채취하여 flat-bottom microplates (Nunc, Roskilde, Denmark)에 다시 옮겼다.

LDH release assay는 ELISA (microtiter plate reader, Roche, Mannheim, Germany)를 이용하였는데 우선 시약 (LDH substrate mixture)을 100 μl 첨가하고 빛을 차단한 상태의 실온(15—25°C)에서 30분간 반응시킨 후, stop solution인 1N HCl 50 μl 로 반응을 중지시켜 490—492 nm의 흡광도에서 측정하였다. spontaneous LDH 측정을 위한 well에는 배양액 만을 첨가하고 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH의 최대치를 알기 위한 maximum LDH well에는 triton X-100 용액을 첨가하여 세포가 완전히 용해되도록(total lysis) 배양하였다. 독성의 백분율(% of cytotoxicity)은 각각의 배양액으로부터 유리된 LDH로 다음과 같은 공식을 이용했다.¹¹⁾

$$\% \text{ of cytotoxicity} = \frac{\text{LDH}_{\text{experimental}} - \text{LDH}_{\text{effector cells}} - \text{LDH}_{\text{spontaneous}}}{\text{LDH}_{\text{maximal}} - \text{LDH}_{\text{spontaneous}}} \times 100$$

LDH_{experimental}: resulting from co-culture of effector cells and target cells

LDH_{effector cells}: resulting from separately cultured effector cells

LDH_{spontaneous}: resulting from separate cultures of YAC-1 cells (low control)

LDH_{maximal}: resulting from total lysis of YAC-1 cells by triton X-100 (high control)

모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고 통계처리는 Sigma-Stat (Version 2.03, SPSS, USA)을 사용하였다. 통계 방법으로 two way analysis of variance를 이용하였으며 대조군과의 다중비교는 Dunnett's 방법으로 하고 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의 하다고 판정하였다.

결 과

기계적 자극에 대한 통증역치

좌골신경 부분절제 모델의 von Frey 필라멘트에 의한 통각과민 검사에서는 신경절제를 한 실험동물 모두에서 1주일과 2주일 모두 수술 전과 비교하여 유의하게 통증 역치의 감소를 보이는 통각과민 상태를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 1).

NK 세포의 세포독성

표적세포인 YAC-1 세포에서 유리된 LDH로 분석한 비장의 NK세포 세포독성 능력은 말초 신경절제 후 1주일에는 정상 위에 비하여 LDH가 유의하게 증가하였으나(1 : 50, 1 : 100) 2주일에는 유의하게 감소되었다(1 : 50) ($P < 0.05$)(Fig. 2).

고 찰

본 실험에서는 좌골신경의 부분 절제가 유의한 통각과민 상태를 초래하는 신경병증성 통증을 만들고 이로 인해 비특이적 일차 면역을 담당하는 NK세포의 세포독성능력이 통증의 초기 1주일에 증가하였다가 2주일에는 다시 감소한다는 것을 알 수 있었다.

지금까지 말초신경 손상에 의한 신경병증성 통증에 대한 연구에서 백서를 이용한 실험 모델인 좌골신경을 결찰하는 방법은 결찰로 인한 신경손상이 축삭섬유의 탈수초화를 일으켜^{5,6)} 척수 내 생화학적, 신경학적인 변화를 일으키고 이로 인해 통각과민 상태가 된다는 것이 밝혀진 바 있다.^{7,12)} 그러나 면역학적인 변화를 관찰 목적으로 하는 연구에서 이 실험 모델을 사용하는 경우의 단점은 신경을 결찰한 수술용 접합사 같은 이물질에 의한 염증반응을 배제할 수 없다는 것이다. 즉, 국소적인 T 림프구의 침윤이나 대식세포의 활성화는 침해수용체를 감작시켜 이 역시 기계적 이질통 등을 유발할 수 있는데,^{7,8,13)} 이 경우 통증의 신경병증성 요인과 염증성 요인을 구분하기 어렵게 만든다. 이와는 대조적으로 신경을 부분 절제할 경우는 염증소견을 보이지 않으면서도 통증과민의 정도는 신경을 결찰한 모델과 비슷하게 나타나며 회복도 40일에서 60일 걸리는 느린 감각신경의 재생을 보인다.¹⁴⁾ 이러한 신경손상 후의 느린 신경회복은 사람에서의 신경병증성 통증과 더 관련되어 있으므로

Fig. 1. Development of mechanical sensitivity on 1 week and 2 weeks after the partial sciatic nerve transection injury (PSI). Mechanical allodynia was assayed by the paw withdrawal response (PWR) using von Frey filament. PSI induced a significant decrease in the PWR compared with that observed on day 0, the preoperative values. Data are presented as mean $\pm$ SD, $n = 6$. * $P < 0.05$ compared with day 0.

Fig. 2. The percentage of cytotoxic activity of splenic NK cells, as determined by lactate dehydrogenase release from YAC-1 tumor cells, showed that the values are dependent on the time after partial transection of sciatic nerve. 1 : 25, 1 : 50, and 1 : 100 represent the effector-target ratio. Values are mean $\pm$ SD, $n = 6$. * $P < 0.05$ versus control.

이러한 견지에서 신경 부분절제 모델은 우리가 흔히 임상에서 접하는 신경손상의 기전에 좀더 적합하다고 보고 있다.⁷⁾ 본 연구에서는 비장을 적출하여 NK세포를 분리하는 1주일과 2주일에 모두 기계적 이질통을 확인할 수 있어 C3H/HeN (H-2k) 마우스에서도 신경병증성 통증이 유지됐음을 알 수 있었다.

면역기관은 스트레스에 특히 민감한데^{15,16)} 급성의 스트레

스는 면역기능을 증강시키는 반면, 만성 스트레스는 면역억제를 초래하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 통증은 면역기관의 반응에 더 복잡한 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. Herzberg 등은⁴⁾ 좌골신경을 결찰한 백서에서의 신경병증성 통증이 지연성 과민반응을 증가시키는 반면, 항원에 대한 면역 글로불린 치는 감소시킨다고 하였으나, Tsai 등은¹⁸⁾ NK 세포의 세포독성이나 비장 림프구의 증식능력 정도는 별다른 차이를 보이지 않았다고 보고한 바 있다.

NK세포는 림프구의 극히 일부분이지만 면역 방어기전에 중요한 부분을 차지하는데 T 림프구와 B 림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다.¹⁹⁾ 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라²⁰⁾ B 림프구의 면역 글로불린 생산을 조절하는²¹⁾ 면역계의 억제 세포(suppressor cells)이기도 한다.²²⁾

대부분의 연구에서 NK 세포 활성 역시 급성 스트레스 상황에서 일시적으로 증강되지만 만성적인 스트레스에서는 활성이 감소된다고 보고되어 있다.²³⁻²⁵⁾ NK세포 활성이 약해지거나 없어지는 것은 질환을 나타내는 신호라 볼 수 있어 이는 치료 중의 호흡기 감염 등의 합병증을 방지하기 위한 면역기능을 판단하는 데 예측인자가 되기도 한다.^{23,26,27)}

임상적으로 신경 병증성 통증의 환자에서 측정된 NK세포의 세포독성 감소는 그 수적인 감소가 아니라 기능의 저하이다.²⁸⁾ 이러한 NK 세포의 기능저하는 증상이 나타나기 전 면역계에 가해진 반복적 자극이 원인이 되어 이차적인 기능저하(exhaustion)가 온다고 한다. 통증과 NK세포의 기능저하가 비례할 수는 없으나 임상적으로 더 심한 상태를 초래할 수도 있으며, 이는 활성화된 T 림프구가 골수에 대한 항체를 생산하여 더욱 NK 세포의 활성을 억제하기 때문이기도 하다.²⁸⁾

한편, 급성 통증기에 NK세포활성이 억제된다는 보고도 있지만,²⁹⁾ 대부분 혈액중의 T 림프구의 활성화가 여러 사이토카인을 유리시키기 때문에 NK세포를 활성화시킨다는 보고가 많다.³⁰⁾ 사실 염증이나 스트레스 초기에 증가되는 interferon은 NK세포를 조절하는 중요한 역할을 하고 있으며³¹⁾ 수술 등에 의한 NK세포의 활성은 50분 내에 일시적으로 크게 증가하여 그 후 24시간까지는 감소한다고 한다.³²⁾ 이러한 반응들은 국소마취제에 의한 감각 신경차단으로 막을 수 있으며,³⁰⁾ 세포독성 기능이 떨어진 NK 세포는 술 후의 암세포의 전이와도 관련될 수 있다.³³⁾

본 연구에서도 신경절제 후 1주일에는 표적세포에 대한 세포독성이 증가하는 것을 볼 수 있었으나 2주일째에는 반

대로 감소하는 것을 보여 만성통증에 의한 지속된 스트레스가 NK세포의 활성을 저해하는 것을 예측할 수 있었다.

지속되는 통증에 의한 면역기능의 저하의 기전은 교감신경의 긴장도와 관련되어 있다. 이는 면역반응을 관장하는 이차 림프 기관이 있는 비장은 교감신경의 지배를 받고 있기 때문이다.⁴⁾ 실험적으로 교감신경을 자극하면 NK 세포의 활성이 감소하고, 반대로 교감신경은 절단하면 면역활성이 증가한다. 스트레스에 의해 감소된 NK세포 활성은 비장의 교감신경을 절제하면 그 반응이 덜해진다고 한다.³⁴⁾

사실 스트레스에 의한 면역반응은 스트레스의 종류, 강도, 기간, 빈도 등에 의해, 또 개체의 특성 즉, 종이나 성별, 체중, 나이 등에 의해 달라질 수 있으며,^{35,36)} 실험실에서의 결과를 임상적으로 적용하기에는 변수가 많다. 그러나 신경병증성 통증이 우리 신체의 면역 항상성에 영향을 미친다면 특히, 면역기능이 억제되는 경우 만성통증 치료 중의 감염 위험성과 암성통증의 치료 과정에서 전이의 증가 가능성에 대하여 관심을 기울이고 있어야 하겠다.

참 고 문 헌

1. Bucinskaite V, Lundeberg T, Stenfors C, Belfrage M, Hansson P, Theodorsson E: Changes of neuropeptide concentrations in the brain following experimentally induced mononeuropathy in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 1995; 192: 93-6.
2. Sacerdote P, Bianchi M, Manfredi B, Panerai AE: Intracerebroventricular interleukin-1 (alpha) increases immunocyte beta-endorphin concentrations in the rat: involvement of corticotropin-releasing hormone, catecholamines, and serotonin. *Endocrinology* 1994; 135: 1346-52.
3. Sacerdote P, Manfredi B, Bianchi M, Panerai AE: Intermittent but not continuous inescapable footshock stress affects immune responses and immunocyte beta-endorphin concentrations in the rat. *Brain Behav Immun* 1994; 8: 251-60.
4. Herzberg U, Murtaugh M, Beitz AJ: Chronic pain and immunity: mononeuropathy alters immune responses in rats. *Pain* 1994; 59: 219-25.
5. Bennett GJ, Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33: 87-107.
6. Sotgiu ML: Descending influence on dorsal horn neuronal hyperactivity in a rat model of neuropathic pain. *Neuroreport* 1993; 4: 21-4.
7. Moalem G, Xu K, Yu L: T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience* 2004; 129: 767-77.
8. Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET: Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic

- pain. *Neurosci Lett* 1995; 184: 5-8.
9. Lindenlaub T, Sommer C: Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain* 2000; 89: 97-106.
10. Sunagawa M, Okada M, Guo SY, Hisamitsu T: Splenic natural killer cell activity is suppressed by ligation of unilateral mental nerve in rats. *Masui* 2000; 49: 250-4.
11. Konjević G, Jurišić V, Spužić I: Corrections of the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1997; 200: 199-201.
12. Guilbaud G, Benoist GM, Jazat F, Gautron M: Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *J Neurophysiol* 1990; 64: 1537-54.
13. Sommer C, Schafers M: Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed Wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 1998; 784: 154-62.
14. Baron R, Maier C: Painful neuropathy: C-nociceptor activity may not be necessary to maintain central mechanisms accounting for dynamic mechanical allodynia. *Clin J Pain* 1995; 11: 63-9.
15. 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.
16. Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, Fleshner M: Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: 1321-9.
17. Anderson G, Harman BC, Hare KJ, Jenkinson EJ: Micro-environmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 2000; 12: 457-64.
18. Tsai YC, Won SJ, Lin MT: Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. *Pain* 2000; 88: 155-60.
19. Herberman RB, Ortaldo JR: Natural killer cells: their roles in defense against disease. *Science* 1981; 214: 24.
20. Shah PD, Gilbertson SM, Rowley DA: Dendritic cells that have interacted with antigen are targets for natural killer cells. *J Exp Med* 1985; 162: 625-36.
21. Becker JC, Kolanus W, Lonnemann C, Schmidt RE: Human natural killer clones enhance in vitro antibody production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Scand J Immunol* 1990; 32: 153-62.
22. Kuwano K, Arai S, Munakata T, Tomita Y, Yoshitake Y, Kumagai K: Suppressive effect of human natural killer cells on Epstein-Barr virus-induced immunoglobulin synthesis. *J Immunol* 1986; 137: 1462-7.
23. Sato N, Kikuchi S, Sato K: Quantifying the stress induced by distress in patients with lumbar disc herniation in terms of natural killer cell activity measurements: chromium release assay versus multiparameter flow cytometric assay. *Spine* 2002; 27: 2095-100.
24. Kiecolt-Glaser JK, Cacioppo JT, Malarkey WB, Glaser R: Acute psychological stressors and short-term immune changes: what, why, for whom, and to what extent? *Psychosom Med* 1992; 54: 680-5.
25. Whiteside TL, Friberg D: Natural killer cells and natural killer cell activity in chronic fatigue syndrome. *Am J Med* 1998; 105: 27S-34.
26. Logan HL, Lutgendorf S, Kirchner HL, Rivera EM, Lubaroff D: Pain and immunologic response to root canal treatment and subsequent health outcomes. *Psychosom Med* 2001; 63: 453-62.
27. Cohen S, Line S, Manuck SB, Rabin BS, Heise ER, Kaplan JR: Chronic social stress, social status, and susceptibility to upper respiratory infections in nonhuman primates. *Psychosom Med* 1997; 59: 213-21.
28. Yoshii F, Shinohara Y: Natural killer cells in patients with Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 1998; 157: 175-8.
29. Kiecolt-Glaser JK, Page GG, Marucha PT, MacCallum RC, Glaser R: Psychological influences on surgical recovery. perspectives from psychoneuroimmunology. *Am J Psychol* 1998; 53: 1209-18.
30. Greisen J, Hokland M, Grofte T, Hansen PO, Jensen TS, Vilstrup H, et al: Acute pain induces an instant increase in natural killer cell cytotoxicity in humans and this response is abolished by local anaesthesia. *Br J Anaesth* 1999; 83: 235-40.
31. Michael A, Hackett JJ, Bennett M, Kumar V, Yuan D: Regulation of B lymphocytes by natural killer cells. Role of IFN-gamma. *J Immunol* 1989; 142: 1095-101.
32. Shakhar G, Ben-Eliyahu S: In vivo beta-adrenergic stimulation suppresses natural killer cell activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. *J Immunol* 1998; 160: 3251-8.
33. Page GG, McDonald JS, Ben-Eliyahu S: Pre-operative versus postoperative administration of morphine: impact on the neuro-endocrine, behavioral, and metastatic-enhancing effects of surgery. *Br J Anaesth* 1998; 81: 216-23.
34. Hori T, Katafuchi T, Take S, Shimizu N, Nijima A: The autonomic nervous system as a communication channel between the brain and the immune system. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2: 203-15.
35. Wood PG, Karol MH, Kusnekov AW, Rabin BS: Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain Behav Immun* 1993; 7: 121-34.
36. Labeur MS, Arzt E, Wieggers GJ, Holsboer F, Reul JM: Long-term intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone administration induces distinct changes in rat splenocyte activation and cytokine expression. *Endocrinology* 1995; 136: 2678-88.