Lipopolysaccharide 자극에 의한 비장세포 증식 정도로 본 Propofol의 면역억제: BALB/c Mice에서 BrdU 측정을 이용한 실험적 연구

가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 마취통증의학과, *소아과

유주현 · 송호경 · 정대철* · 유건희 · 진윤선

The Inhibitory Effect of Propofol on Splenocytes Proliferations to Lipopolysaccharide in BALB/c Mice: Based on the Measurement of BrdU Incorporation *in vitro*

Joo Hyun You, M.D., Ho-Kyung Song, M.D., Dae Chul Jeong, M.D.*, Keon Hee Ryu, M.D., and Yun Sun Chin, M.D.
Departments of Anesthesiology and Pain Medicine, *Pediatrics, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Anesthetics have been suspected of impairing various aspects of the immune function either directly by affecting the function of immunocompetent cells or indirectly by modulating the stress response. Splenocytes play important roles in the cellular host defense against infection. In order to assess the immune modulatory effects of propofol, this study examined the cytotoxic and proliferative effects of propofol on splenocytes.

Methods: Splenocytes, as responders, were isolated from BALB/c mice (n = 10). The cells were pretreated with different propofol concentrations (0 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M) for 24 hours. The cytotoxic effect was assayed by the NADH dehydrogenase activity and the proliferation was evaluated by the level of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation during DNA synthesis in the presence or absence of propofol, in addition to lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/ml) for mitogenic stimulation. A cell proliferation enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) system was used, and the stimulation index was calculated in the presence or absence of propofol.

Results: The percentage of the NADH dehydrogenase activity was changed by the propofol pretreatment (P < 0.001). LPS stimulation significantly decreased the NADH dehydrogenase activity at 100 μ M and 300 μ M compared with the propofol-added or pretreated cells (P < 0.05). The stimulation index to LPS was lower at concentrations of 100 μ M and 300 μ M than at 30 μ M, and proliferative response of splenocytes were completely abrogated by adding toxic concentrations (100 μ M) of propofol (P < 0.05).

Conclusions: Neither cytotoxicity, as defined by the NADH dehydrogenase activity, nor a proliferative effect, as measured by the level of (BrdU) incorporation in the splenocytes, were affected by the clinical concentration of propofol. (Korean J Anesthesiol 2008; 54: 74~80)

Key Words: anesthetics, cell proliferation, cytotoxic effect, immune response, propofol, splenocyte.

서 론

면역계의 변화를 일으킬 수 있는 악성종양이 있거나 장기이식 후 면역 억제제 등의 약물이 투여되거나 감염으로 인한 패혈증 등이 있는 상태에서 시행되는 수술과 마취는 환자의 술 후 사망률과 유병률에 크게 영향을 미친다.^{1,2)} 이

는 수술이나 마취가 단핵세포나 림프구의 수를 감소시키는 동시에 스트레스에 대한 적절한 면역반응을 방해하기 때문이다.³⁻⁵⁾ 이미 대부분의 마취제가 직접적으로 면역세포를 억제하거나 간접적으로 스트레스 반응 조절에 관여하는 등 술후 일시적으로 면역기능에 영향을 주는 것으로 보고되어 있는데 정맥 마취제의 경우 특이적인, 혹은 비 특이적인 면역반응의 변화를 보인다.⁶⁻¹⁰⁾

최근 중환자 치료에 있어 집중치료의 질을 높이기 위하여 환자의 수면이나 진정 상태 등이 중요시 되면서 장기간 propofol을 투여하는 경우가 많아지고 있다. 수술 전·후의 환자들에게 propofol을 투여하는 것이 다른 마취제들과 비교하면 면역기능에 미치는 영향이 적다고는 하지만⁹⁻¹²⁾ 백혈구나 중성구의 활성이 변화되고^{13,14)} 대식세포의 이동이나 포

논문접수일 : 2007년 9월 6일

책임저자 : 송호경, 인천시 부평구 부평 6동 665번지

성모자애병원 마취통증의학과, 우편번호: 403-720

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

E-mail: genovia@catholic.ac.kr

본 논문은 가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 학술연구 조성비 지원에 의해 이루어졌음.

식작용(phagocytosis), 시토카인(cytokine) 생성에 영향을 미친다.¹⁵⁾ 그러나 여러 가지 원인에 의한 패혈증에서와 같이 면역활성이 변화되어 있는 경우 propofol이 면역반응을 담당하는 비장세포의 증식에 영향을 미치는지에 대해서는 아직 보고된 바 없다.

저자들은 장시간 여러 농도의 propofol 처치가 비장세포의 활성을 억제하는 세포독성이 있는지를 사립체의 NADH dehydrogenase의 활성을 이용하여 검토하고자 하였다. 또한 전신적으로 염증반응이 일어난 상태에서 propofol이 비장세포의 증식을 방해하는지 알아보기 위해 실험적으로 LPS를 이용한 패혈증 상태를 만들어 쥐의 비장세포 분열을 자극하고, 세포 분열 시에 DNA에 결합되는 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)를 측정함으로써 비장세포의 증식 정도를 평가하였다.

대상 및 방법

실험동물

본 연구는 임상연구 윤리 위원회의 승인을 받은 후 시행하였으며 연구 관리규정을 준수하였다. 실험동물로는 체중 20-25 gm 내외의 BALB/c mice (Charles River Japan Inc, Tokyo, Japan) 10마리를 사용하였다. 실험 전 최소 1주일 동안 공기 정화기능과 에어컨이 조절되는 환경에 적응시키면서 소독된 짚(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. 동물 실온 온도 23°C 상대습도 50-55%로 유지하고 12시간 간격으로 명암이 조절되게 하였다.

비장세포 분리와 배양

10마리의 쥐를 경추 탈골로 희생시킨 다음, 70% ethanol로 배부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출하였다. 멸균된 homogenizer로 비장을 균질화 시킨 다음, 50 ml 시험관에 망을 올려 놓고 이를 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배양액(GibcoBRL)으로 적신 후, 균질화 된 비장을 통과 시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 세척하였다. 이어 적혈구 용해 용액과 PBS (phosphate buffered saline)이 동량으로 혼합된 용액을 이용, 적혈구를 제거한 다음, PBS 용액으로 다시 두 번 세척하여 비장세포만을 분리하였다. 세포를 배양하기 전에 Trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인 한 후, 조직배양액인 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)내에서 37°C, 5%의 CO₂ 조건의 배양기를 이용하여 배양하였다.

Propofol의 세포독성 평가

본 연구에서는 임상에서 마취 후의 변화나 중환자실에서의 장시간 투여를 가정한 조건으로 처음 propofol 처리 후, 다시 면역세포의 분열을 유도하는 패혈증의 조건을 유지한다는 의미에서 LPS를 사용하였고, 동시에 propofol을 처리하였다.

비장세포의 증식에 있어 propofol의 세포에 대한 직접적인 독성 영향을 배제하기 위하여 우선 Dojindo의 수용성 tetrazolium salt를 이용한 Cell Counting Kit-8 (CCK-8)를 이용하여 세포 증식 중 살아있는 세포 만을 확인하였다.¹⁶⁾ 이는 [3H]-thymidine incorporation assay에 비하여 비 방사성이면서도 비교적 정확하게 어떤 물질의 세포증식이나 세포독성 평가하는데 유용한데, 원리는 WST-8[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]가 살아있는 세포 내 사립체의 NADH dehydrogenase에 의해 환원되면서 오렌지 색으로 변화하여 조직 배양액에 용해되는 formazan을 생성한다. NADH dehydrogenase의 활성에 의한 formazan의 양이 바로 살아있는 세포 수의 비율과 일치한다고 할 수 있다.

실험방법은 우선, 각각의 propofol 농도(0 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M)에서 비장세포를 24시간 배양하여(Pre-PRF군) 일부는 NADH dehydrogenase 활성을 이용한 세포독성 여부를 평가한 뒤, 나머지 일부는 다시 LPS로 세포분열 자극을 주거나(LPS군), LPS와 동시에 propofol을 다시 배양액에 첨가하여(LPS + PRF군) NADH dehydrogenase의 활성을 측정하여 세포독성 정도를 평가하였다. 0 μ M은 대조를 위하여 배양액에 아무런 처리도 하지 않았다. 세포 수는 2×10^4 개로 하였으며, 96-well plate에 100 μ l의 세포 부유 액으로 만들어 24시간 동안 5% CO₂와 온도 37°C의 조건에서 배양한 다음, 각각의 propofol 농도 하에서 24시간 더 배양한 후 발색 정도를 측정하였다. 이렇게 propofol로 처리된 세포의 일부는 배양액을 세척한 후, 새로운 배양액에 LPS 1 μ g/ml 혹은 동량의 LPS와 각 농도의 propofol을 혼합하여 다시 48시간 배양하였다. 이후 10 μ l의 CCK-8 용액을 첨가하고, 4시간 후, 450 nm의 흡광도에서 발색 정도를 측정하였다.

세포의 독성 정도는 NADH dehydrogenase 활성의 농도에 따른 변화로 LPS를 처리하지 않은 unstimulated splenocyte의 값을 모든 측정치에서 뺀 다음, 0 μ M을 기준(control)으로 하여 다음과 같이 계산하였다.

Percent change of NADH dehydrogenase activity

$$= \frac{\text{Absorbance of PRF or LPS exposed well}}{\text{Absorbance absolute control well}} \times 100$$

LPS 자극에 의한 비장세포 증식 정도

비장세포의 면역반응의 지표로는 세포분열 자극물질인 LPS (serotype: E.coli 055 : B5, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 반응하는 세포증식의 정도로 평가하였다. 반응의 정도는 세포 증식의 증가 혹은 감소로 측정 하였으며, 림프구의 최초 세포 수는 RPMI 1640에 부유시킨 상태에서 1×10^5 의 농도가 되도록 하였다. 우선 propofol의 전처치가 림프구의 반응에 영향을 주는지 보기 위해 각각의 propofol 농도(0 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M)에서 24시간 동안 5% CO₂와 온도 37°C의 조건으로 비장세포를 배양하였다(Pre-PRF). 이를 원심 분리하여 세포를 분리하고, 세척한 후 증식을 자극하기 위한 LPS 1 μ g/ml (LPS군), 혹은 동량의 LPS와 각각의 농도(0 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M)의 propofol을 배양액에 첨가하여(LPS + PRF군) flat-bottomed 96-well plates에서 다시 24시간 같은 배양 조건에서 배양하여 세포의 증식 정도를 측정하였다. 역시 0 μ M은 대조를 위해 배양액에 아무 처리도 하지 않았다.

세포증식의 정도는 DNA 합성 시에 결합되는 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)를 이용한 효소결합 면역반응(ELISA) 시스템(Roche Molecular Biomedicals, Mannheim, Germany)을 이용하였는데^{17,18)} BrdU를 첨가한 후의 반응시간은 18시간으로 하였다. 이후 배양액을 제거하고, 세포들은 FixDenat (Roche Molecular Biochemicals)로 실온에서 1시간 고정하였다. 항체의 결합은 anti-BrdU-peroxidase로 24°C에서 90분 처리하고 세척한 후, substrate solution을 첨가하여 실온에서 10분 기다려 photometric detection에 충분하도록 발색시켰다. Absorbance value는 370 nm에서 ELISA reader (SpectraMax 250; Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)로 하였다. 비특이적 결합을 보기 위한 대조로는 propofol이나 LPS가 섞이지 않은 배양액 자체의 흡광도를 기준으로 하였다. 세포의 증식 정도는 다음과 같이 계산하였다. LPS를 처리하지 않은 unstimulated splenocyte의 값을 모든 측정치에서 빼 다음, 0 μ M을 기준(OD of control)으로 하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Stimulation Index} = \frac{[(\text{OD of experiment}) - (\text{OD of control})]}{\text{OD of control}} \times 100$$

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

Fig. 1. The cytotoxic assays of propofol on mouse splenocytes to LPS (1 μ g/ml). Adding propofol (30 μ M, 100 μ M, 300 μ M) to mouse splenocytes and 24 hrs culture in vitro (pretreatment), show significant increase in the NADH dehydrogenase activity ($P < 0.001$). After pretreating cells with propofol at different concentrations, the cytotoxicity in response to LPS is assayed by NADH dehydrogenase activity. Pre-PRF: pretreatment with propofol, LPS: LPS added, LPS + PRF: LPS and propofol added. The data are expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate measurements of 5 separate experiments. *†: $P < 0.05$ vs. LPS group.

결 과

Pre-PRF군에서 propofol의 세포독성 여부는 임상농도 보다 높은 독성 농도에서도 사립체의 NADH dehydrogenase의 활성은 영향을 받지 않았으며, propofol 농도의 증가에 따라 유의한 변화를 보였다(Fig. 1, $P < 0.001$). LPS군의 NADH dehydrogenase의 활성은 Pre-PRF군과 LPS + PRF군에 비해 의미 있는 군 간 차이를 보였으며($P < 0.001$), 독성 농도의 propofol (100 μ M, 300 μ M)에서는 0 μ M과 30 μ M에 비하여 NADH dehydrogenase의 활성이 의미있게 감소하였다($P < 0.05$). 그러나 이때 LPS와 함께 propofol을 배양액에 첨가하는 경우는 LPS로만 세포자극을 하는 경우에 비해 NADH dehydrogenase의 활성이 유지되었다(Fig. 1, $P < 0.05$).

Propofol의 세포증식에 대한 결과는 여러 가지 다른 농도의 propofol에서 비장세포를 24시간 배양한 전처치 후 LPS를 첨가하여 다시 배양한 결과, 증식의 정도인 자극지수(stimulation index)를 0 μ M의 자극지수를 기준으로 하여 계산하였을 때, 농도에 따라 감소되어, 임상농도의 자극지수에 비하여 독성농도의 propofol (100 μ M, 300 μ M)로 전처치 한 경우에 의미 있는 감소를 보였다(Fig. 2, $P < 0.001$). 또한 전처치한 비장세포를 LPS자극과 동시에 배양액에 propofol을 첨가한 LPS + PRF군은 독성 농도의 propofol (100 μ M, 300 μ M)에서 30 μ M의 임상농도에 비해 세포증식이 크게 감소하였고($P < 0.05$), LPS군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig.

Fig. 2. Comparison of the inhibitory effect of LPS on mouse splenocytes proliferation at different concentrations of propofol. The data are expressed as the means of triplicate measurements of 5 separate experiments. *: $P < 0.001$ vs. $30 \mu\text{M}$.

3, $P < 0.05$).

고 찰

본 연구에서는 쥐의 비장세포가 여러 농도의 propofol에 장시간 노출되었을 때, LPS에 의한 세포분열 자극, 즉 패혈 증에서의 림프구의 증식이 영향을 받는지를 알아보았다. 우선, 임상농도의^[12,15] propofol이 비장세포에 세포독성이 있는지를 확인하기 위해 측정된 세포 내 NADH dehydrogenase 활성 변화는 24시간의 propofol 노출 후에도 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 그러나 LPS에 의해서는 NADH dehydrogenase 활성 감소로 보아 세포독성이 증가할 수 있으며, 이때 propofol은 이 같은 LPS의 세포 독성을 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

한편, 세포 분열과정에서 핵에 결합되는 BrdU를 측정하여 증식의 정도를 검토해 본 결과, 임상농도의 propofol에서는 LPS에 의한 비장세포의 증식은 영향을 받지 않았으나 독성 농도의 propofol에서는 증식이 방해됨을 알 수 있어 증식의 정도에는 독성 농도가 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

체내의 면역을 담당하는 세포들은 감염이나 자연 과민 피부반응, 이식편대 숙주질환, 악성 종양 세포의 발생 방지 등의 중요한 역할을 한다. 면역세포들은 생체 내에서는 어떤 항원, 실험적으로는 세포 분열 촉진물질 등에 의하여 분열 증식하는 특징이 있고, 이를 측정하는 방법으로 세포 분열 시 결합되는 [3H]-thymidine을 이용하는 방법이 있다. 이는 세포의 증식 시 새로이 만들어지는 세포의 DNA의 복제 시에 [3H]-thymidine를 표지함으로써 증식의 정도를 측정하는 방법인데, 방사성 동위원소를 사용하여야 하고, 그에 따르는 폐기, 인력에 따르는 문제 등의 단점이 있다. 이러한

Fig. 3. The inhibitory effects of propofol on mouse splenocytes proliferation to LPS. Adding propofol to LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) stimulated cells significantly reduce the stimulation index at the concentration of $100 \mu\text{M}$ and completely abrogates proliferative response at the concentration of $300 \mu\text{M}$ ($P < 0.05$). The data are expressed as the means of triplicate measurements of 5 separate experiments. Data is expressed as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs. LPS group, †: $P < 0.05$ vs. $30 \mu\text{M}$.

문제를 극복하기 위해 DNA 합성을 비 방사성 방법으로 측정하는 방법이 연구되었는데 이것이 [3H]-thymidine 대신 pyrimidine 유사체인 BrdU를 분열하는 세포의 DNA에 결합시키는 방법이다.^[16,17] 이는 간단하면서도 빠르고 정확한 ELISA를 이용한 방법으로 실험적으로 시토킨에 의한 서로 다른 세포주의 증식이나 항원, 분열 촉진제 등에 의한 면역세포들의 증식 등 영향을 미치는 여러 조건들을 평가할 수 있다.^[18]

마취제가 면역계에 미치는 영향에 대해서는 술 후 일시적으로 면역기능이 떨어지지만 별다른 임상 합병증과는 관련되지 않는다는 보고부터^[6] 여러 마취 유도제와 흡입마취제가 사람과 동물에서 마취제에 폭로된 시간에 관계되어 림프구의 증식을 비롯한 면역기능을 억제한다는 보고까지 다양한 결과들이 있다.^[3,4,9,19] 일반적으로 전신마취는 시토킨 생성을 증가시키고,^[20,22] 수술부위에 면역세포 등을 침윤시키며,^[4,23] 또한 세포들의 증식을 억제하는데^[24] 사실, 대부분의 경우 수술 후 순환되는 T 림프구의 수는 감소하고,^[23] 정상 수치로 돌아올 때까지 수일이 걸린다.^[25] 이러한 변화는 손상의 정도에 따라 달라지는데 큰 수술일수록 염증세포의 이동이나 시토킨의 변화가 크게, 빨리 일어난다.^[26]

그러나 propofol의 경우, 다른 마취 유도제에 비해 실험적으로는 그 용해제인 10% Intralipid까지도 림프구의 기능을 억제하지 않는다는 초기의 실험 연구의 발표로부터 실제 임상에서 면역억제 상태이거나 감염의 위험이 있는 환자에서도 안전하게 사용할 수 있다고 알려져 있다.^[9,27]

그러나 면역세포를 이용한 시험관 내 연구에서 정상인의 면역세포도 대부분의 마취제에 의해 증식 정도가 둔화된다고 하는데, 특히 propofol, midazolam과 ketamine 마취 후 림프구의 증식이 거의 일어나지 않는 것으로 보고되어 있고,²⁸⁾ 임상에서는 신경외과 환자의 두개강 내압의 감소를 목적으로 장시간 thiopental을 주입하는 경우 감염의 위험이 높아지는 경우도 보고된 바 있다.²⁹⁾ 그러나 Pirttikangas 등의³⁰⁾ propofol과 isoflurane 마취 후 환자의 림프구의 증식 정도를 비교한 보고에서는 propofol 마취가 중환자를 제외한 건강한 개체는 수술에 의한 조직손상이 크지 않은 경우는 림프구의 증식에 영향을 미치지 않는다고 하였으며,³⁰⁾ 오히려 T 림프구의 비율이 증가함을 발견할 수 있었는데 이는 midazolam, ketamine, thiopentone 등에 비하여 interleukin-1-alpha 나 interferon-gamma의 생성이 증가하기 때문이라고 설명하였다.³¹⁾

그러나 Schneemilch 등은³²⁾ 높은 농도의 propofol에서만 phytohemagglutinin에 의해 말초 단핵세포의 증식이 억제된다고 하였고, 이는 저자들의 결과에서와 같이 세포 독성이나 비장세포의 증식이 농도에 관계 되어 억제 되는 것과 일치 하였다.

마취제나 수술 자체로 인해 말초혈액 내 림프구의 세포자멸사가 증가 되는데 반해 실험적으로 propofol에 림프구를 배양했을 경우 임상 농도나 그 열 배의 농도에서도 세포자멸사가 일어나지 않는다고 하였고,³³⁾ 세포독성이 없는 농도 (30 μ M) 즉, 임상 농도에서는 nitric oxide에 의한 세포사를 차단할 수 있다고 한다.¹²⁾ 그러나 nitric oxide로부터 세포를 보호하는 효과는 시간에 의존적으로 감소하여 24시간이 지나면 매우 감소하는데¹²⁾ 이는 propofol이 빛과 공기에서 분해되고³⁴⁾ cytochromeP450-dependent monooxygenases에 의해 변성되기 때문이다.³⁵⁾ 본 연구에서도 propofol의 세포독성이 임상과 독성농도에서 모두 NADH dehydrogenase활성을 유지하였는데 이는 쥐 대식세포를 24시간 동안 propofol에 노출시킨 후에도 NADH dehydrogenase 활성이 처음과 같이 유지되었던 Wu 등의¹⁵⁾ 결과와 일치하였다. 특히 높은 농도에서 활성이 증가한 것은 생체 내에서와는 달리 in vitro에서 면역세포의 세포자멸사가 크게 증가하지 않기 때문일 수도 있겠다. 또한 24시간 후 propofol의 효과가 떨어진 다음의 LPS 자극은 현저히 NADH dehydrogenase 활성을 떨어뜨려 LPS의 세포독성을 의심할 수 있고, 이때 첨가된 propofol이 그 활성을 유지하게 한 것으로 추론할 수 있으나 이 관점에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다. 이 같은 림프구의 반응을 억제하는 분자생물학적 기전은 흡입마취제의 경우 칼슘이온의 이동 방해, adenylate cyclase phosphodiesterase의 효소 평형 조절, 신호전달과 유전자 전사의 변화, nitric oxide 생성 억제, nitric oxidase 합성제의 발현 등으

로 설명하고 있다.^{36,37)}

LPS는 Gram 음성균에 의한 패혈증에 주된 표지라 할 수 있는데, 패혈증 초기에는 면역이 활성화되나, 패혈증 말기에 림프구의 기능이 약화되어 병원성 감염의 위험이 높아지게 한다.³⁸⁾ 이렇게 LPS는 림프구의 증식을 방해한다고는 하나 아직 패혈증에 의한 면역억제에 관해서는 확실히 밝혀진 것은 없다. 패혈증 등의 질환이 있는 중환자에게서 채취된 면역세포만이 propofol에 의해 증식이 억제된다는 보고와 같이³⁰⁾ 본 연구에서도 세포 분열을 위한 자극 물질로 사용한 LPS가 패혈증의 병리학적 조건을 만들어 비장세포 증식을 억제하였다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 임상농도의 propofol은 세포에 어떤 독성영향이 없이 세포의 활성은 유지시키지만 LPS 처리 후에 즉, 세포분열이 자극되어야 하는 환경에서는 어떤 원인으로 증식을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 이것은 패혈증 시 일차적 면역 억제 기전이 역시 LPS에 의한 면역세포의 증식 억제라는 것을 시사한다. 그러나 이러한 면역세포의 증식을 방해하는 기전이 염증을 억제시키는 즉, 면역세포의 활성을 억제하는 항 염증 시토카인의 증가, 혹은 다른 생물학적 매개체 때문인지는 앞으로 연구가 필요하다. 저자들의 연구에서 세포 분열촉진 물질로 사용한 LPS는 매우 높은 농도(1 μ g/ml)라 할 수 있겠다. 그러나 세포를 이용하는 in vitro 연구에서는 매우 강한 자극이 필요할 수 있어 초 생리적(supraphysiological) LPS 농도(10 μ g/ml)라야 면역억제를 초래한다.³⁸⁾ 사실, 환자의 혈중 LPS는 이보다 낮으며, 패혈증의 원인과 시간의 경과에 따라 다른 결과를 보일 수 있다. 왜냐하면 혈중 LPS는 혈액 내에서 용해되는 부분과 세포의 수용체에 결합하는 부분이 빠른 속도로 혈중농도를 감소시키므로 임상적인 패혈증의 혈중농도와 실험적으로 혈중에 첨가되는 이론적인 LPS 농도와 크게 다르기 때문이다. 즉, 4시간이 지나면 1%만이 혈중에 남게 되고, 우리가 측정하는 LPS는 단지 결합되지 않은 LPS를 의미할 뿐이라는 것이다.³⁸⁾

지금까지 수술 후의 면역억제에 관한 많은 임상 연구에서 수술 전·후의 말초혈액을 이용해 왔다. 그러나 이는 마취 이외의 수술에 의한 조직손상, 수혈, 수술 전 투약, 환자의 영양상태, 약물치료, 기왕력 등 여러 인자가 관련되어 영향을 미치고 결과를 다르게 만들 수 있다는 것을 고려해야 한다.⁴⁾ 임상적으로 마취제가 면역계에 미치는 영향은 사실 이러한 여러 인자들을 조절할 수 없기 때문에 더욱 확실한 결론을 내리기 어려운 형편이다.³⁶⁾ 이러한 점에서 동물실험은 스트레스 없이 조절된 조건하에서 키워지고, 수술에 의한 조직손상 등 면역에 영향을 미치는 요소들을 제외할 수 있어 실험약제의 면역억제 효과를 관찰할 수 있는 좋은 모델이 될 수 있다.³⁶⁾ 본 실험에서도 유전적으로 조절된 동물을 이용하였고, 최대한 조절된 환경에서 키운 뒤 무

균적으로 비장을 적출하였다.

결론적으로 본 연구에서는 실험적인 장시간의 고 농도에 서의 propofol 적용은 마우스 비장세포의 활성화는 유지하지만 LPS의 세포분열 자극에 의한 비장세포의 증식 정도는 억제 하였고 임상 허용 농도에서는 세포의 활성화나 증식에 영 향을 미치지 않았다.

참 고 문 헌

1. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY: Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-21.
2. Atwell DM, Grichnik KP, Newmann MF, Reves JG, McBride WT: Balance of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines at thoracic cancer operation. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 1145-50.
3. Helmy SA, Wahby MA, El-Nawaway M: The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production. *Anaesthesia* 1999; 54: 733-8.
4. Salo M: Effect of anesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 36: 201-20.
5. McBride WT, Armstrong MA, McBride SJ: Immunomodulation: an important concept in modern anaesthesia. *Anaesthesia* 1996; 51: 465-73.
6. Corrêa-Sales C, Tosta CE, Rizzo LV: The effects of anesthesia with thiopental on T lymphocyte responses to antigen and mitogen in vivo and in vitro. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 117-28.
7. Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniv L, Jeager K, Piepenbrock S: Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four iv anesthetics on respiratory burst of neutrophils. *Br J Anaesth* 1996; 77: 387-92.
8. O'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Axbury AJ: Comparison of the inhibitory effects of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 1992; 69: 70-4.
9. Delvin EG, Clarke RSJ, Mirakhor K, McNeill TA: Effect of four iv induction agents on T-lymphocyte proliferations to PHA in vitro. *Br J Anaesth* 1994; 73: 315-7.
10. Salo M, Pirttikangas CO, Pulkki K: Effects of propofol emulsion and thiopentone on T helper cell type-1/type-2 balance in vitro. *Anaesthesia* 1997; 52: 341-4.
11. Richardson PSR, Cooke K, Gerrish P, Rees KC, Rennie IG: Natural killer and lymphokine activated cytotoxicity following anaesthesia in patients with uveal malignant melanoma. *Melanoma Res* 1997; 7: 129-37.
12. Chang H, Tsai S, Chang Y, Chen T, Chen R: Therapeutic concentration of propofol protects mouse macrophages from nitric oxide-induced cell death and apoptosis. *Can J Anesth* 2002; 49: 477-80.
13. Mikawa KH, Akamatsu K, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obera H, et al: Propofol inhibits human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1998; 87: 695-700.
14. Hofbauer RM, Frass H, Salfinger H, Moser H, Hornykewycz S, Gmeiner B, et al: Propofol reduces the migration of human leukocytes through endothelial cell monolayers. *Crit Care Med* 1999; 27: 1843-7.
15. Wu GJ, Tai YT, Chen TL, Lin LL, Ueng YF, Chen RM: Propofol specifically inhibits mitochondrial membrane potential but not complex 1 NADH dehydrogenase activity, thus reducing cellular ATP biosynthesis and migration of macrophages. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 168-76.
16. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K: A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1518-20.
17. Porstmann T, Temyck T, Avrameas S: Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 1985; 82: 169-79.
18. Huong PL, Kolk AH, Eggelte TA, Verstijnen CP, Gilis H, Hendriks JT: Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. *J Immunol Methods* 1991; 140: 243-8.
19. Platt M, Platt S, Royston D: Lymphocyte proliferation: dichotomy of effect of related anaesthetic agents. *Brit J Anaesth* 1986; 58: 132.
20. Ford HR, Hoffmann RA, Wing EG, Magee DM, McIntyre L, Simmons RL: Characterisation of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* 1989; 124: 1422-8.
21. Wkaszczyk A, Adamik B, Durek G, Kulber A, Zimecke M: Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: serum level of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha and the ability of peripheral blood mononuclear cells to proliferate and produce these cytokines in vitro. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1996; 44: 225-34.
22. Mitsuhata H, Shimizu R, Yokoyama MM: Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmac* 1995; 17: 529-34.
23. Moore TC: Anaesthesia associated depression in lymphocyte traffic: less with regional anaesthesia than with general. *Am J Surg* 1984; 148: 71-5.
24. Atallah M, Motawea A, el-Chennawy F, Atallah AF: Immunological assays following exposure to halothane in clinical usage. *Eur J Anaesthesiol* 1991; 8: 459-64.
25. Salo M, Nissla M: Cell-mediated and humoral immune responses to total hip replacement under spinal or general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1990; 34: 241-8.
26. Grzelac I, Olsewski W, Engeset A: Influence of operative trauma on circulating blood mononuclear cells: analysis using monoclonal antibodies. *Eur Surg Res* 1984; 16: 105-12.
27. O'Donnell GA, O'Donnell NG, McSharry CP, Asbury AJ: Comparison of the effects of anaesthetic agents on mitogen induced lymphocyte proliferation in vitro. *Anaesthesia* 1991; 67: 658-9.
28. Chanimov M, Bermant S, Weissgarten J, Averbukht Z, Cohen M,

- Grinshpun, et al: Substances used for local and general anaesthesia in major surgery suppress proliferative responsiveness of normal rat peripheral blood mononuclear cells in culture. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17: 248-55.
29. Eberhardt KE, Thimm BM, Spring A, Maskos WR: Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infection in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturates: a prospective case study. *Infection* 1992; 20: 12-8.
  30. Pirttikangas CO, Perttinen J, Salo M: Propofol emulsion reduces proliferative responses of cells from intensive care patients. *Intens Care Med* 1993; 19: 299-302.
  31. Rossano F, Tufano R, Cipollaro-de-L'Ero G, Servillo G, Baroni A, Tufano MA: Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14: 439-50.
  32. Schneemilch CE, Hachenberg T, Ansorge S, Ittenson A, Bank U: Effects of different anaesthetic agents on immune cell function in vitro. *Eur J Anaesthesiol* 2005; 22: 616-23.
  33. Delogu G, Famularo G, Moretti S, De Luca A, Tellan G, Antonucci A, et al: Interleukin-10 and apoptotic death of circulating lymphocytes in surgical/anesthesia trauma. *J Trauma* 2001; 51: 92-7.
  34. Sebel PS, Lowdon JD: Propofol; a new intravenous anaesthetic. *Anesthesiology* 1989; 71: 260-77.
  35. Simons PJ, Cockshott ID, Douglas EJ, Gordon EA, Hopkins K, Rowland M: Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of oil in water emulsion of 14C-propofol. *Xenobiotica* 1988; 18: 429-40.
  36. Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC: The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990; 72: 542-52.
  37. Nakamura K, Terasako K, Toda H, Miyawaki I, Kakuyama M, Nishiwada M, et al: Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane and sevoflurane. *Can J Anaesth* 1994; 41: 340-6.
  38. Yaqub S, Solhaug V, Vang T, Solberg R, Aasen A, Tasken K, et al: A human whole blood model of LPS-mediated suppression of T cell activation. *Med Sci Monit* 2003; 9: 120-6.
-