

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 한국 재래산양의 혈중 호중구 및 복강 대식구의 기능에 미치는 영향

김종만 · 마점술* · 전윤성*

가축위생연구소

서울대학교 수의과대학*

(1991. 4. 24 접수)

Effects of levamisole, selenium and tocopherol on the functions of blood neutrophil and peritoneal macrophage of Korean native goats

Jong-man Kim, Jum-sool Mah,* Yun-seong Jeon*

Veterinary Research Institute, RDA

College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Apr. 24, 1991)

Abstract: In this study, the immunomodulating effects of levamisole, selenium and tocopherol on blood neutrophils and peritoneal macrophages of goat were evaluated *in vitro* and *in vivo*.

The functions of blood neutrophils and peritoneal macrophages were assayed by random and direct migration, phagocytosis of *S aureus*, production of superoxide and hydrogen peroxide.

The results obtained were summarized as follows:

• *In vitro* trials

1. Levamisole treatment enhanced the random and direct migration of goat blood neutrophils when compared with untreated cell, and a significant ($p < 0.01$) enhancement was noticed at the concentration of $100\mu\text{g}$ for direct migration and $50\mu\text{g} \sim 1,000\mu\text{g}$ per ml of culture medium for random migration. There was no influence of selenium and tocopherol on random and direct migration of neutrophil at all of treatment concentration.
2. Neutrophils produced higher levels of superoxide by levamisole treatment at the concentration of $100\mu\text{g}$ and by selenium treatment at the concentration of $1.0\mu\text{g}$, but the production of hydrogen peroxide was not increased. Tocopherol had no effect on the production of antimicrobial oxygen metabolites of neutrophils at various concentrations.
3. No differences of phagocytic activity were observed when neutrophils were treated with three substances.

• *In vivo* trials

1. Blood neutrophils of goats orally administered levamisole showed significantly ($p < 0.05$) higher random migration from 2 to 24 hours after feeding (2.5mg/kg of body weight). Augmentation of random migration of neutrophil from goats orally administered selenium-tocopherol mixture (selenium $100\mu\text{g}$ -tocopherol 200IU/head/day) was observed at 10 days and the significant ($p < 0.05$) increase was shown from 30 days after feeding and continued throughout the feeding periods.

2. There was no effect on phagocytic activity and production of antimicrobial oxygen metabolites of neutrophils from goats administered levamisole or selenium-tocopherol mixture.
3. Random migration, production of superoxide and hydrogen peroxide and *S aureus* phagocytic activity of peritoneal macrophages of goats administered 300ml of levamisole-thioglycollate medium mixture (2.5µg/ml) into peritoneal cavity increased significantly ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) when compared with those of goats administered thioglycollate medium alone.

Key word: Korean native goat, levamisole, selenium, tocopherol, blood neutrophil, peritoneal macrophage.

서 론

동물체내의 호중구는 이물질 침입부위에 제일 먼저 출현하여 세포외 감염미생물의 탐식과 살균작용에 가장 활동적인 역할을 하며 염증반응에 관여하는 주요 세포이다.^{1,2} 대식구는 체내의 여러 조직에 분포하면서 마이리스 및 세포내 감염미생물의 탐식과 살균, 림프구에 항원물질 제공 및 림프구 활성화물질을 생성하여 림프구의 기능을 증진시킨다.³ 따라서 혈중 호중구와 조직내 대식구는 생체방어의 최일선을 담당하는 탐식 세포들이며 체액 및 세포면역에도 직 간접적으로 관여하는 면역세포이다.

이러한 면역세포의 기능과 활성은 많은 요인에 의하여 영향을 받게되며 스트레스, 각종 비타민 및 미네랄 결핍, 그리고 미생물감염 등에 의하여 저하된다.⁴⁻⁶

이와같은 각종 요인에 따른 면역세포 기능저하로 인하여 발생하는 질병을 치료 예방하기 위하여 이들의 활성을 증강시키는 면역조절제의 개발 및 이용연구가 활발히 수행되고 있다. levamisole은 본래 동물의 구충제로 개발되었으나 그후 면역증강 효과가 있다는 것이 밝혀진 약제이며 탐식세포 운동에 관계되는 Ca^{2+} 의 세포질내로의 유입조장과 cGMP양을 증가시켜 탐식구의 유주능과 살균능을 높인다고 하였다.^{7,8}

Selenium은 활성화한 탐식세포가 생성하는 O_2^- 나 H_2O_2 를 분해하는 catalase, glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase 같은 효소계의 필수성분으로서 세포에 유해한 산소대사산물로부터 세포막과 세포내 기관들을 보호하며, 체액 및 세포면역 기능을 유지 증진하는데 필요한 성분이다.^{9,10}

tocopherol은 필수 영양소로서 selenium과 유사하게 항산화제로 작용하여 활성화한 oxygen radical과 peroxidase를 분해하여 세포를 보호하고 체액 및 세포면역능을 강화시킨다고 하였다.¹¹ 그러나 현재까지 연구된 이 제제들의 동물에의 이용연구는 많지 않으며 더욱이 생체와 시험관내 실험을 연계해서 탐식구의 기

능에 미치는 영향을 상호비교한 연구는 아직 수행된 바가 없다.

본 연구에서는 levamisole, selenium 및 tocopherol이 탐식세포의 기능에 미치는 영향을 비교 규명하기 위하여 이들 약제를 사용하여 한국재산양의 혈중 호중구 및 복강 대식구의 기능을 시험관내에서와 생체내에서 시험하였다.

재료 및 방법

실험동물: 체중 15~20kg의 한국재래 암산양 14두를 사용하여 5두는 정상 혈중 호중구와 복강 대식구를 분리하여 시험관내에서 영향을 검사할 목적으로 사용하였으며, 9두는 3두씩 3군으로 나누어 levamisole급여군, selenium-tocopherol급여군 및 급여하지 않은 대조군으로 하여 동일한 사양조건에서 사육하면서 생체에서의 영향을 시험하였다.

공시균주: 호중구와 대식구의 탐식능을 시험하기 위하여는 미국 National Animal Disease Center에서 분양받은 *Staphylococcus aureus* Newbould주 (ATCC 29740)를 사용하였다.

Levamisole 및 selenium-tocopherol의 산양투여: levamisole은 산양 체중 kg당 2.5mg을 1주 간격으로, selenium-tocopherol 혼합액은 selenium 100µg과 tocopherol 200IU를 1두분으로 하여 1일 1회씩 56일간 경구로 급여하면서 호중구를 분리하여 기능검사를 하였으며, 복강 대식구의 기능은 levamisole을 thioglycollate broth에 용해하여 (2.5µg/ml) 3두의 산양에 300ml씩을 복강내로 주입하였고 2두의 대조산양에는 같은 양의 thioglycollate broth만을 주입한 후 24시간에 대식구를 분리하여 시험하였다.

혈중 호중구 및 복강 대식구 분리: 혈중 호중구는 경정맥으로 부터 45ml의 혈액을 채혈하여 항응고제인 2%ACD액(sodium citrate 22.52g, citric acid 8.0g, dextrose 22.0g, distilled water 500ml) 5ml와 혼합하고 2,500rpm 20분간 원심분리하여 buffy coat를 제거

한 후 20ml lysing액(sodium phosphate dibasic 1.5g, sodium phosphate monobasic 0.32g, D.W 1,000ml, pH7.2)으로 40초간 용혈시킨 것을 10ml의 restoring액(sodium phosphate dibasic 1.5g, sodium phosphate monobasic 0.32g, sodium chloride 27g, D.W 1,000 ml, pH7.2)을 가하여 등장액화 하였다. 이것을 1,500 rpm으로 5분간 원심후 상층액을 제거하고 lysing액과 restoring액으로 1회이상 반복처리한 다음 PBS(0.01 M, pH7.2)로 1회 원심세척하여 0.5ml의 RPMI 1640 배지(Sigma)에 부유하고 혈구계산기(Fisher)로 계수하여 호중구수를 시험에 따라 조정하여 기능검사를 하였다.

복강 대식구는 산양을 도살하여 복강을 절개하고 적당량의 PBS로 복강을 세척하여 백혈구를 수집한 후 PBS로 3회 원심세척하고 조직배양용 RPMI 1640 배지에 부유시켜 조직배양용 plate에 5ml씩 분주하여 5% CO₂ 항온기에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 배지와 함께 부유세포들을 제거한 후 37°C로 가온한 PBS로 1회 세척하고 플라스틱면에 부착한 대식구를 차가운 PBS로 세척 수집하여 세포수를 조정하여 시험하였다.

시험관내 호중구의 levamisole, selenium 및 toco-pherol 처리 : levamisole hydrochloride(Sigma), sodium selenite(Sigma) 및 dl- α tocopherol(Sigma)를 각각 조직배양용배지[RPMI 1640배지 (Sigma) 88%, fetal bovine serum 10%, L-glutamine(200mM) 1%, 항생제액(penicillin 200IU/ml, streptomycin 200 μ g/ml) 1%]로 농도를 달리하여 희석한 제제액과 세포를 혼합하여 CO₂ 항온기에서 37°C, 30분간 작용시킨 후 각종 기능검사를 하였다.

Random 및 direct 유주능 조사 : agarose법에 의한 유주능검사를 위하여 agarose type I (Sigma) 0.8g을 80ml 증류수로 가열 용해하여 50°C로 식히고, 비동화한 fetal calf serum 10ml와 10^x Medium 199 (Sigma) 9ml를 가한뒤 pH를 7.2로 조정하여 직경 60mm의 조직배양용 사레에 5ml씩 분주하여 agar plate를 만들었다.

random 유주능은 agar plate에 gel 천공기로 직경 3mm의 hole을 만들어 세포부유액(10⁷/ml) 10 μ l를 가한다음 5% CO₂ 항온기에서 37°C, 18시간 작용시켰다. 작용후 8% glutaraldehyde로 2~3시간 실온에서 고정 한 후 agarose gel 층을 제거하고 Wright's/Giemsa 염색액으로 1분간 염색하여 objective micrometer(Nikon)로 호중구의 유주면적을 측정하였다. 즉, 유주면적= π (유주거리 반지름)²- π (hole 반지름)².

direct유주능은 4mm 간격으로 직경 3mm의 hole 3개를 만들어 가운데 hole에 세포부유액(10⁷/ml) 나머지 두 hole에 PBS와 opsonized zymosan serum(OZS)을 각각 10 μ l씩 가하고 5% CO₂ 항온기에서 37°C, 4시간 작용시킨 후 고정 염색하여 direct 유주거리를 objective micrometer를 이용하여 측정하였다. 즉, direct 유주거리(chemotactic difference)=OZS쪽으로 유주한 거리-PBS쪽으로 유주한 거리.

포도상구균 탐식능 조사 : *S aureus*를 37°C, 18시간 배양한 뒤 PBS로 세척하여 얻은 균액(2 \times 10⁸/ml) 100 μ l, Earl's balanced salt solution(EBSS, Sigma) 100 μ l, 10배로 희석한 *S aureus* 항혈청 100 μ l를 혼합한 후 37°C, 30분간 작용시켰다. 이와같이 처리한 균 부유액에 탐식세포(2 \times 10⁶/ml) 100 μ l를 가한 즉시와 37°C에서 2시간 작용시킨 후의 세균탐식능을 표준평판 배양법으로 생균수를 측정하여 탐식율을 산정하였다.

호중구의 *S aureus* 탐식상태를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 반응시간 별로 세포를 수집하여 3%(v/v) glutaraldehyde, 0.1M osmium tetroxide 및 ethanol로 처리하여 주사전자현미경(Hitachi, S-570)으로 그 형태를 관찰하였다.

초산화물(O₂⁻) 산생능 검사 : 조직배양용 flat bottom microplate(Costar)를 사용하여 탐식세포(2 \times 10⁶/ml) 50 μ l와 EBSS 50 μ l를 혼합한 것, 탐식세포 50 μ l에 EBSS 25 μ l 및 opsonized zymosan(OZ) 25 μ l를 혼합한 것을 각 well에 분주하고 37°C에서 30분 작용시킨 다음 각 well에 nitroblue tetrazolium(NBT) 액(2mg/ml) 100 μ l씩을 가하여 다시 30분간 반응시킨 후에 1N HCl 25 μ l를 가하여 반응을 중지시켰다. 이와같이 처리한 결과 생성한 formazan을 항온실에서 1주야 건조시킨 다음 DMSO 100 μ l를 가하여 microplate shaker에서 진탕하여 녹인 뒤 최고 흡수파장 560nm에서의 발색정도에 따른 흡광도(OD)를 ELISA reader(Titertec multiscan)로 판독하여 O₂⁻의 생성량을 측정하였다.

과산화수소(H₂O₂) 산생능 검사 : 조직배양용 flat bottom microplate에 탐식세포(2 \times 10⁶/ml) 50 μ l와 EBSS 50 μ l를 혼합한 것, 호중구 50 μ l에 EBSS 25 μ l 및 OZ 25 μ l를 혼합한 것을 각 well에 분주한 후 37°C에서 30분 작용시킨 다음 각 well에 phenol red액(NaCl 140mM, potassium phosphate buffer 10mM, pH7.2, dextrose 5.5mM, phenol red 0.28g/l, horse radish peroxidase 19IU/ml) 100 μ l씩을 가하여 다시 37°C에서 30분 반응시키고 1N의 NaOH 25 μ l를 넣어 반응을 중단시킨 다음 최고 흡수파장 600nm에서의 발색정도에 따른 흡광도를 ELISA reader로 판독하여 H₂O₂ 산생량

을 조사하였다.

결 과

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 시험관내에서 호중구의 **random** 및 **direct** 유주에 미치는 영향 : 시험관내에서 공시약제 농도별로 호중구를 처리한 후 유주면적과 거리를 검사한 결과, levamisole처리 호중구의 random유주는 50 μ g에서 1,000 μ g까지의 농도에서 유주면적이 17.81~20.13mm²으로 무처리 대조세포의 14.53mm²에 비하여 현저한 유주능의 증가를 나타내었으며 (p<0.01), direct유주는 100 μ g에서 1.33mm로서 대조세포의 1.04mm에 비하여 유의하게 증가하였다.

Selenium처리 호중구는 5.0 μ g에서 random 및 direct 유주가 완전히 억제되었으나 0.25 μ g에서 1.0 μ g까지의 농도에서는 대조세포보다 증가한 유주능을 보였으나

유의한 차이는 아니었다.

Tocopherol은 시험한 3.12IU에서 100IU까지의 처리에서 호중구의 유주능에 영향을 나타내지 않았다(Table 1).

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 시험관내에서 호중구의 O₂⁻ 및 H₂O₂ 산생에 미치는 영향 : 체계별로 호중구를 처리하여 NBT assay로 O₂⁻산생능을 검사한 결과 levamisole 100 μ g 및 selenium 1.0 μ g으로 처리하였을때 OD치가 0.991과 0.769로서 대조세포의 0.869와 0.621에 비하여 O₂⁻산생량이 유의하게 증가하였으나 (p<0.05) tocopherol은 영향을 나타내지 않았다.

H₂O₂ 산생은 levamisole 25 μ g에서 100 μ g까지, selenium 0.25 μ g에서 0.5 μ g까지의 농도에서 무처리 대조세포에 비하여 생성량이 증가하였으나 유의한 차이는 아니었다(Table 2).

Table 1. Effect of *in vitro* treated levamisole, selenium and tocopherol on the migrations of blood neutrophil of Korean native goat

Substances treated	Concentrations of substances	Mitgration of neutrophil (n=5)	
		Random migration (mm ²)	Direct migration (mm)
Levamisole	2,500 μ g	14.06±2.34	1.01±0.29
	1,000	17.81±3.58*	1.03±0.21
	500	17.94±5.11*	1.04±0.15
	100	20.13±4.92**	1.33±0.21**
	50	18.31±2.49**	1.21±0.22*
	25	15.18±1.45	1.12±0.28
	Control	14.53±0.98	1.04±0.28
Selenium	5.0 μ g	NM ^a	NM
	1.0	22.28±1.22	1.24±0.16
	0.5	22.52±1.70	1.24±0.14
	0.25	22.34±1.59	1.18±0.12
	0.12	21.54±1.53	1.23±0.21
	0.06	21.62±1.46	1.08±0.17
	Control	21.07±1.51	1.13±0.57
Tocopherol	100IU	6.55±1.22	1.20±0.39
	50	6.49±1.06	1.28±0.19
	25	6.77±1.87	1.24±0.35
	12.5	6.94±1.01	1.35±0.16
	6.25	6.95±1.03	1.21±0.23
	3.12	7.24±1.17	1.21±0.24
	Control	6.75±1.06	1.23±0.12

a: No migration.

Table 2. Effect of *in vitro* treated levamisole, selenium and tocopherol on the production of oxygen metabolites of blood neutrophil of Korean native goat

Substances treated	Concentrations of substances	Production of oxygen metabolites of neutrophil	
		Superoxide (OD 560nm)	Hydrogen peroxide (OD 600nm)
Levamisole	2,500 μ g	0.785 \pm 0.20	0.759 \pm 0.12
	1,000	0.881 \pm 0.24	0.769 \pm 0.62
	500	0.912 \pm 0.22	0.764 \pm 0.11
	100	0.991 \pm 0.25 ^{∗∗}	0.812 \pm 0.82
	50	0.938 \pm 0.20	0.795 \pm 0.90
	25	0.885 \pm 0.18	0.875 \pm 0.32
	Control	0.869 \pm 0.14	0.720 \pm 0.16
	Selenium	5.0 μ g	0.385 \pm 0.16
1.0		0.769 \pm 0.18 [*]	0.597 \pm 0.21
0.5		0.726 \pm 0.34	0.627 \pm 0.13
0.25		0.718 \pm 0.36	0.612 \pm 0.25
0.12		0.636 \pm 0.28	0.519 \pm 0.20
0.06		0.634 \pm 0.30	0.560 \pm 0.19
Control		0.621 \pm 0.32	0.570 \pm 0.20
Tocopherol		100IU	0.265 \pm 0.09
	50	0.260 \pm 0.11	0.450 \pm 0.12
	25	0.249 \pm 0.15	0.456 \pm 0.14
	12.5	0.267 \pm 0.09	0.450 \pm 0.15
	6.25	0.262 \pm 0.12	0.450 \pm 0.15
	3.12	0.253 \pm 0.15	0.458 \pm 0.21
	Control	0.259 \pm 0.14	0.456 \pm 0.19

The cells were stimulated by opsonized zymosan at 37°C for 30 minutes before addition of NBT or phenol red solution.

Table 3. Effect of oral administration of levamisole on neutrophil functions of Korean native goat

Experiments	Functions of neutrophil after oral administration			
	Pre administration	Post 2 hours	Post 24 hours	Post 7 days
Random migration(mm ²)	26.7 \pm 3.27	37.3 \pm 4.35 [*]	43.6 \pm 4.37 ^{**}	32.0 \pm 4.25
Direct migration(mm)	1.20 \pm 0.24	1.36 \pm 0.15	1.23 \pm 0.31	0.96 \pm 0.11
Superoxide production(OD)	0.785 \pm 0.22	0.866 \pm 0.27	0.840 \pm 0.30	0.774 \pm 0.28
Hydrogen peroxide production(OD)	0.849 \pm 0.33	0.992 \pm 0.33	0.921 \pm 0.40	0.823 \pm 0.29
<i>S aureus</i> phagocytosis(%)	81.3 \pm 4.9	83.3 \pm 7.5	81.0 \pm 6.3	81.6 \pm 8.3

The levamisole(2.5mg/kg of body weight) was administered 4 times at an intervals of a week to 3 Korean native goat.

이들 제제처리가 호중구의 포도상구균 탐식능에는 영향을 나타내지 않았다.

Levamisole 급여가 산양 호중구의 기능에 미치는 효과 : 산양 3두에 levamisole을 체중 kg당 2.5mg씩을

경구급여하고 급여전, 급여후 2시간, 24시간 및 7일에 현중호중구의 기능을 조사한 결과, random 유주는 급여후 2시간과 24시간에 현저하게 증가하였다(p<0.01 및 p<0.05). 그러나 7일 후에는 감소하여 급여전 보

Table 4. Effect of oral administration of levamisole on neutrophil functions of Korean native goat

Experiments	Functions of neutrophil after oral administration				
	Pre administration	Post 10 days	Post 30 days	Post 45 days	Post 56 days
Random migration(mm ²)	17.3±0.91	16.3±0.94	27.3±1.05**	24.0±1.95	22.6±3.17*
Direct migration(mm)	1.00±0.16	1.30±0.16	1.21±0.15	1.18±0.04	1.15±0.08
Superoxide production(OD)	1.012±0.475	1.210±0.358	1.252±0.383	1.191±0.442	1.166±0.428
Hydrogen peroxide production(OD)	0.661±0.28	0.754±0.31	0.772±0.33	0.764±0.24	0.752±0.33
<i>S aureus</i> phagocytosis(%)	85.2±6.40	82.6±7.32	79.0±9.38	81.6±7.39	82.2±8.47

The selenium (100 μ g) and tocopherol(200IU) were administered once daily for 56 days.

다 약간 증가한 유주능을 보였으며 direct 유주능, O₂⁻ 및 H₂O₂ 산생능도 급여후 증가하는 경향을 나타내었으나 급여전과 유의한 차이는 아니었다. 포도상구균 탐식능에는 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다(Table 3).

Selenium-tocopherol 혼합급여가 산양 호중구의 기능에 미치는 효과 : 산양 1두당 selenium 100 μ g과 tocopherol 200IU를 혼합하여 1일 1회씩 56일간 급여하면서 급여전과 급여후 10일, 30일, 45일 및 56일에 각 분리한 호중구의 기능을 조사한 결과, random 유주능은 급여 후 10일 까지는 급여전과 차이가 없었으나 30일 후부터는 현저하게 증가하였으며(p<0.01), 급여중지일인 56일까지 상승된 상태를 유지하였다. 그러나 이 유주능은 56일간 매일 급여하더라도 비례적으로 증가하지는 않아서, 급여 후 30일, 45일 및 56일에서의 유주능 간에는 유의한 차가 없었다. 이들 제제를 급여한 산양 호중구의 direct유주, O₂⁻산생 및 H₂O₂산생능은 급여전에 비하여 증가하였으나 유의한 차는 없었으며 포도상구균 탐식능에는 영향을 나타내지 않았다(Table 4).

Levamisole의 복강내 투여가 대식구 기능에 미치는 영향 : levamisole을 산양 복강내로 300ml(2.5 μ g/ml) 투여후 24시간에 대식구를 분리하여 PPD로 활성화 하였을 때의 기능변화를 조사한 결과 random 유주면적 9.61mm², O₂⁻ 및 H₂O₂ 산생 OD치 0.328과 0.961 그리고 *S aureus* 탐식율 96.6%로서 levamisole 무투여군의 대식구 random 유주면적 7.18mm², O₂⁻ 및 H₂O₂ 산생 OD치 0.306과 0.548 그리고 *S aureus* 탐식율 89.5%에 비하여 현저하게 증가하였다(p<0.01 및 p<0.05).

Levamisole 투여후 24시간에 분리하여 PPD로 활성화하지 않은 대식구의 O₂⁻산생능 및 H₂O₂산생능도 무투여군 대식구에 비하여 현저히 증가하였으나(p<0.01) direct 유주능에는 영향을 나타내지 않았다.

고 찰

호중구와 대식구의 유주는 C5a 등 추화성 물질들이 세포막 수용체에 부착함으로써 세포막 내측에 있는 Ca²⁺ 이온들이 세포질로 유리되면서 세포운동부위의 수축과 이완을 중재하는 microfilament의 활동으로 시작된다. 이 운동계에서 Ca²⁺은 백혈구 유주의 조절인자이다. 세포내의 cAMP는 Ca²⁺이 세포내로 유리되는 calcium gate를 막아 유주를 억제하고 cGMP는 유주를 증진시키는 역할을 한다.¹²

Levamisole은 탐식세포의 세포막에 부착되어 있는 Ca²⁺을 세포질로 유리하게 하고 cAMP와 cGMP를 조절하며, 세포운동에 관여하는 microtubule integrity의 기능을 증강시킨다.¹³ 본 실험에서 levamisole로 시험관내에서 산양 호중구를 처리함으로써 random 유주는 50~1,000 μ g, direct 유주는 100 μ g 농도에서 현저하게 증가하였고 levamisole을 산양에 경구로 급여한 2시간과 24시간에 호중구의 random 및 direct 유주능도 증가하였으며, 복강내 투여후 24시간에 분리한 대식구의 random 유주능도 상승하였다. 이같은 결과는 시험관 또는 생체내 실험에서 levamisole이 호중구의 random 및 direct 유주를 증강시켰다는 보고, levamisole이 10⁻³~10⁻⁴M 농도에서 cGMP 수준을 증가시켰다는 보고,^{14,15}에 levamisole을 주사한 결과 호중구의 유주능이 증가하였다는 성적과¹⁶ 같은 결과이나 연구자에 따라서는 영향을 나타내지 않았다는 보고도 있다.¹⁷ 이같은 연구자간의 차이는 levamisole은 소화관내에서 유속이 빨라 수시간 내에 최고농도에 이르며 대부분 2일내에 뇨중으로 배설되기 때문에 levamisole의 투여시기, 투여량, 투여방법 등 실험조건의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

Selenium과 tocopherol은 작용기전이 유사하며 탐식세포의 respiratory burst로 인하여 생성된 유해한 산소대사산물에 대하여 항산화제로 작용하여 면역세포들

의 기능을 증강시켜 준다.^{10,11} 본 시험결과 시험관내에서 selenium과 tocopherol로 호중구를 처리하였을 때 유주능에 뚜렷한 영향을 나타내지 않았으나 생체내로 이들 체제를 혼합투여 하였을 때는 random 유주능이 현저히 증가하였다. 이러한 생체와 시험관내에서의 결과의 차이는 selenium과 tocopherol을 단독 투여하는 것보다 혼합 투여하는 것이 면역능을 더 증강시켜 준다고 한 보고와,¹⁸ 시험관내에서와 생체내에서의 작용조건 차이 때문으로 사료된다.

호중구와 대식구의 이물질 탐식은 그들 세포막에 있는 C3b와 IgG의 Fc수용체가 중요한 역할을 하며 C3b 수용체는 이물질을 탐식구에 부착시키는 것을 중재하며, Fc수용체는 세포막에 부착한 이물질을 탐식하는데 보다 많은 작용을 한다. 이물질과 수용체가 접촉할 때 세포질내로 신호를 전달하여 세포막 주위의 Ca²⁺을 세포질로 이동시키고 이것에 의하여 cGMP가 증가하고 cAMP는 감소하여 탐식을 촉진하게 된다.^{19,20}

탐식과 유주를 촉진하는 cGMP 수준을 증가시키는 것으로 알려진 levamisole과 면역능을 증가시키는 selenium 및 tocopherol이 호중구의 탐식능에 미치는 효과를 조사한 바 시험관내와 경구급여 시험에서 이들 모두 탐식능에 뚜렷한 영향을 주지 않았다. 이는 소에 levamisole 또는 selenium을 주사하거나 급여하였을 때 탐식능에 효과가 없었다는 성적들과 유사한 결과이다.^{14,21}

호중구와 대식구가 탐식한 미생물을 살균하는데 있어 가장 중요한 것은 respiratory burst에 이어 생성된 O₂⁻와 H₂O₂로서 이들의 생성량은 이물질자극에 의한 탐식구의 반응능력과 미생물 살균능력과 많은 관계가 있다.^{6,22}

Levamisole의 농도를 달리하여 시험관내에서 처리한 호중구의 O₂⁻산생능은 100μg에서 현저하게 증가하였고, 생체시험에서도 경구로 급여후 2시간 부터 이들의 산생능이 급여전에 비하여 증가하였으며 복강내 투여후 분리한 대식구의 O₂⁻ 및 H₂O₂ 산생능도 무투여군에 비하여 상승하였다. 이와같은 결과는 생체나 시험관내에서 levamisole이 살균능이나 O₂⁻생성에 영향을 나타내지 않았다는 보고^{14,17}와는 차이가 있다.

시험관내에서 selenium 1.0μg 농도로 호중구를 처리하였을 때 O₂⁻의 생성이 현저하게 증가하였는데 이러한 결과는 젓소나 사람에서의 급여시험에서 비급여군에

비하여 살균능이 증가하였다는 성적과 조사 방법상 차이 있는 있으나 일치하는 결과로서 selenium이 탐식세포의 살균성 산소대사산물 생성능을 증가시키는데 효과가 있음을 알 수 있다.

성숙한 대식구의 표면에는 탐식을 중재하는 C3b와 Fc 수용체가 있으며, C3수용체는 T 림프구 산물인 lymphokine에 의하여 활성화하여 시험관내에서도 탐식능이 증가할 수 있으며 PPD도 비특이적으로 대식구를 활성화 한다고 하였다.²³

본 실험에서 산양의 복강 대식구 기능이 증가한 결과는 levamisole 투여로 대식구의 전반적인 기능이 상승하였고 활성화한 림프구 산물인 lymphokine에 영향을 받은 것으로 사료된다.

이상에서 고찰한 바와같이 levamisole, selenium 및 tocopherol이 생체내 주요 탐식세포인 호중구와 대식구의 기능에 상승효과가 있다는 것을 다각적인 시험을 통하여 증명할 수 있었으며 본 연구가 앞으로 수의학분야에서 면역세포 기능과 면역현상 연구에 기초자료가 될 것을 기대한다.

결 론

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 탐식구의 기능에 미치는 영향을 시험하기 위하여 산양의 혈중 호중구와 복강 대식구를 공시하여 생체와 시험관내에서 조사하였다.

시험관내에서 levamisole로 호중구를 처리하였을 때 random 및 direct 유주능이 현저히 증가하였으나 selenium과 tocopherol은 뚜렷한 영향을 나타내지 않았다.

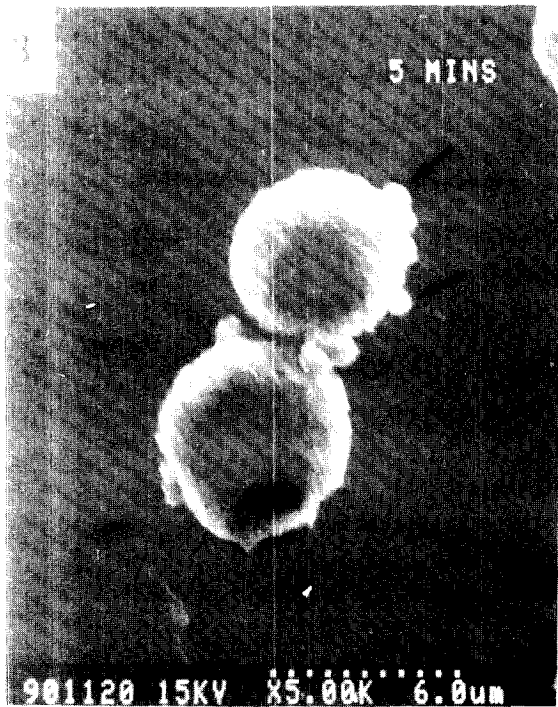
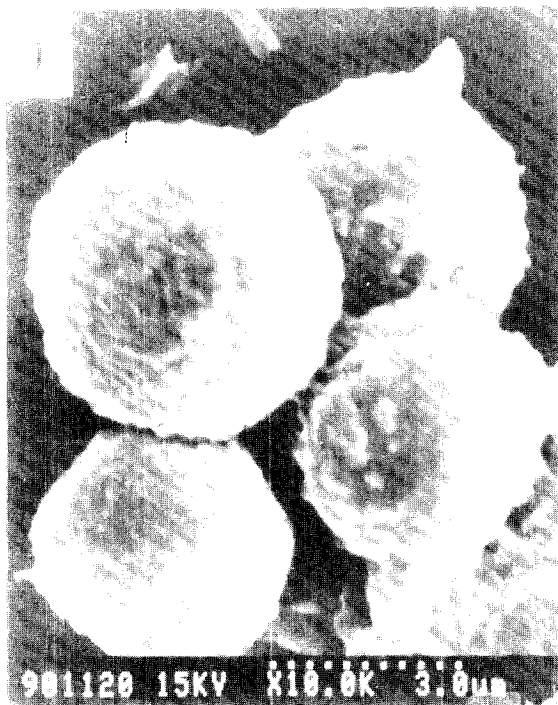
호중구의 O₂⁻산생은 levamisole과 selenium 처리로 현저하게 증가하였으나 H₂O₂ 산생능과 포도상구균 탐식능에는 대조세포와 유의한 차이가 없었다.

생체급여 실험에서, levamisole(2.5mg/kg, 체중) 및 selenium-tocopherol(selenium 100μg, tocopherol 200 IU/1일/1두)을 급여한 산양 호중구의 random 유주능이 현저하게 증가하였으나 (p<0.01), direct유주, O₂⁻ 및 H₂O₂산생능 그리고 포도상구균 탐식능에는 뚜렷한 영향을 볼 수 없었다.

복강내로 levamisole을 주입후 분리한 대식구의 O₂⁻산생능, H₂O₂ 산생능 및 *S aureus* 탐식능은 대조군에 비하여 현저하게 증가하였다.

Legends for figures

- Fig 1.** Scanning electron micrograph of 3 leukocytes whose surface consist of protruding pseudopods, characteristic of active neutrophil at 5 minutes after stimulation with opsonized zymosan. $\times 8,000$.
- Fig 2.** The neutrophil plasma membrane has begun moving about an attached bacterium at 5 minutes after neutrophil and *S aureus* were mixed. The pseudopod and attached *S aureus* (arrow) are shown. $\times 6,000$.
- Fig 3.** *S aureus* (arrows) has attached to the surface of neutrophil at 5 minutes after neutrophil and *S aureus* were mixed. $\times 5,000$.
- Fig 4.** Bacteria has been engulfed completely by the plasma membrane of neutrophil at 10 minutes after mixture of neutrophil and *S aureus*. $\times 4,000$.



참 고 문 헌

1. Densen P, Mandell GL. Phagocyte strategy vs. microbial tactics. *Reviews of Infectious Diseases* 1980;2(5):817-835.
2. Purdy CW, Richards AB, Foster GS. Blood bactericidal assay(*Pasteurella haemolytica*) comparison of morbidity in marketed feeder calves. *Am J Vet Res* 1989;50(2):221-225.
3. Slocombe RF, Malark J, Ingersoll R, et al. Importance of neutrophils in the pathogenesis of acute pneumonic pasteurellosis in calves. *Am J Vet Res* 1985; 46(11):2229-2234.
4. Kehrl ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine peripheral blood neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 1989;50(2):207-214.
5. Swecker WS, Eversole DE, Thatcher CD, et al. Influence of supplemental selenium on humoral immune responses in weaned beef calves. *Am J Vet Res* 1989;50(10):1760-1763.
6. Thompson RA. Immunodeficiency due to defects of polymorphonuclear leukocyte function. *Immunological Investigations* 1988;17(2):85-92.
7. Anderson DC, Hughes BJ, Wible LJ, et al. Impaired motility of neonatal PMN leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1984;36:1-15.
8. Onaga H, Tajima M, Ishii T. Effect of levamisole on the immune response of chickens to infection with *Eimeria tenella*. *Zbl. Bakt. Hyg.* 1984;A256:323-327.
9. Erskine RJ, Eberhart RJ, Hutchinson LJ, et al. Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in dairy herds with high and low somatic cell counts. *JAVMA*. 1987; 190(11):1417-1421.
10. Koller LD, Exon JH. The two faces of selenium-deficiency and toxicity are similar in animals and man. *Can J Vet Res* 1986;50:297-306.
11. Almagor M, Kahane I, Gilon C, et al. Protective effects of the gultathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity* 1986;52(1): 249-244.
12. Smolen JE. Lag period for superoxide anion generation and lysosomal enzyme release from human neutrophils. *Clinical Medicine* 1984;104 (1):1-9.
13. Gallin JI. Abnormal phagocyte chemotaxis. *Reviews of Infectious Diseases*. 1981;3(6):1196-1214.
14. Jayappa HG, Loken KI. Enhancement of the chemotactic response of bovine polymorphonuclear leukocytes by levamisole. *Am J Vet Res* 1982;43(12):2138-2142.
15. Anderson R, Glover A, Koornhof HJ, et al. *In vitro* stimulation of neutrophil motility by levamisole. *The Journal of Immunology* 1976; 117(2):428-432.
16. American Cyanamid. The immunostimulant effect of levamisole. *American Cyanamid Co* 1981:1-34.
17. Roth JA, Kaeberle ML. Effect of levamisole on lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in dexamethasone-treated cattle. *Am J Vet Res* 1984;45(9):1781-1784.
18. Larsen HJ, Tollersrud S. Effect of dietary vitamin E and selenium on the phytohaemagglutinin response of pig lymphocytes. *Research in Veterinary Science* 1981;31:301-305.
19. Rotrosen D, Gallin JI. Disorders of phagocyte function. *Ann Rev Immunol* 1987;5:127-150.
20. Smith GS, Lumsden JH, Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1983;4:177-236.
21. Grasso PJ, Scholz RW, Erskine RJ, et al. Phagocytosis, bactericidal activity, and oxidative metabolism of milk neutrophils from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diets. *Am J Vet Res* 1990;51(2):269-274.
22. Dyer RM, Bs SE, ScM PS, et al. Oxidative metabolism of the bovine alveolar macrophage. *Am J Vet Res* 1989;50(4):448-454.
23. Wright SD, Griffin FM. Activaion of phagocytic cells' C3 receptors for phagtoctytosis. *Journal of Leukocyte Biology* 1985;38:327-339.