

RAW 264.7 대식세포에서 NO, TNF- α , IL-6 생산에 관한 Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl, Chimyl의 효과

김영호^{1,2} · 윤현중¹ · 문명이¹ · 이준행^{2,3} · 박행순¹ · 김종세^{2*}

¹전남대학교 약학대학 약품개발 연구소

²조선대학교 자연과학대학 생물학과

³남부대학교 방사선학과

Production of NO, TNF- α and IL-6 by Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl Solutions in RAW 264.7 Macrophage Cells

Young Ho Kim^{1,2}, Hyun Joong Yoon¹, Myoung E Moon¹,
Jun Haeng Lee^{2,3}, Haeng Soon Park¹ and Jong Se Kim^{2*}

¹College of Pharmacy, Research Institute of Drug Development, Chonnam University, Gwangju 500-757, Korea,

²Dept of Natural Science, Biology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea,

³Dept of Radiological Science, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate the effect of Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl solutions on the production of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in RAW 264.7 macrophage cells after treatment of *C.albicans*. The cytotoxic effects was evaluated by the lactate dehydrogenase (LDH). All solutions did not affect on the LDH and NO production by itself. At 6th hour, the TNF- α and IL-6 production was not affected by each solutions. However, at 24th hour, the TNF- α and IL-6 production was affected by itself ($p < 0.05$). Each solution in the presence of *C.albicans* decreased the *C.albicans*-induced TNF- α and IL-6 production compared with *C.albicans* only ($p < 0.05$, $p < 0.01$). These results suggest that Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl solutions will increase the immune response on the *C.albicans*-induced damage.

Key words: TNF- α , IL-6, NO, LDH, *C.albicans*, Squalene, Alkoxy Glycerol

서 론

Tumor necrosis factor- α (이하, TNF- α)는 분자량이 25 kDa, cachectin으로 알려진 물질로 기전이 아직도 정확히 규명되지는 않았지만, 주로 단핵세포와 대식세포에서 생산되고, 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증유도매개 사이토카인으로 세포의 성장과 분화, apoptosis, necrosis 등의 기능에 관여하며 혈관 투과성을 증가시킨다(1-3). TNF- α 는 미생물 감염 시 발현량이 증가하고, 식세포의 사이토카인 분비 증가를 유도하여 미생물에 대한 숙주세포의 항상성을 유지하는 중요한 방어기전 역할을 담당한다. 종양 발생 시 apoptosis를 유도하여 종양 발생의 감시 기전으로 이용되기도 하고, 호중구 조절, MHC 발현의 조절, B세포 증식, angiogenesis 유도 및 대식세포 활성화 기능을 가지고 있다(4,5). 그러나, 다량의 TNF- α 발현은 심근 수축력 감소, 혈압 강하, 대사 과정의 손상을 유발하기도 한다(6-8).

Interleukin-6(이하, IL-6라 함)는 분자량이 21 kDa, 212 개 아미노산 잔기로 이루어진 다양한 기능을 가진 단백질로 대식세포와 T-세포에 의해서 생산된다(9,10). IL-6는 TNF- α 와 IL-1과 함께 급성기 단백질반응의 유도체로서 anti-inflammatory와 pro-inflammatory cytokine으로 알려져 있다(11). IL-6는 granulocyte-macrophage colony stimulating factor(이하, GM-CSF라 함), interferon- γ (이하, IFN- γ 라 함), macrophage inflammatory protein-2(이하 MIP-2라 함)와 같은 pro-inflammatory cytokine의 생산을 억제하는 작용을 가지고 있다. 또한, IL-6는 CD⁴⁺ T-세포, cytotoxic T-세포 분화와 NK 세포 기능을 자극하고, IL-1ra 합성과 수용성 TNF 수용체 방출을 유도하는 작용을 가지고 있다(12-14).

Nitric oxide(이하, NO라 함)는 암세포나 대식세포에서 감염된 미생물에 대한 cytotoxic agent로서 면역학적으로 작용한다(15,16). NO는 PC12 cells에서 LPS에 의해 유도되는 염

*Corresponding author. E-mail: kyh5656@korea.com
Phone: 82-62-230-6641. Fax: 82-62-230-7984

증반응을 TNF와 대식세포의 활성을 통해 apoptosis를 조절하는 작용을 가지고 있다(17).

Squalene(hexamethyltetracosahexane, $C_{30}H_{50}$, 이하 SQ라 함)은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구물질로 심해 상어의 간, 올리브유 등에 많이 함유된 탄화수소로 피부, 복부지방조직, 피하지방조직, 림프절, 체장 및 심근 등에 다량 함유되어 있다(18). SQ는 6개의 이중결합이 있어 산소이온과 쉽게 결합할 수 있어서 유해 산소 제거능이 있으며(19), 상처 치유, 혈관 확장, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 간질환 등에 효과가 있으며(20), 화상 치료(21), 카드뮴 독성 완화(22), 항암효과(23), 세포면역 반응 조절 및 항산화제 활성 효과(24), 급성신부전에서 섬유아세포 성장인자 활성 효과가 있다고 보고하였다(25).

Glyceryl ether(=Alkoxyglycerol, 이하, AG라 함)은 사람의 꿀수, 비장, 모유, 우유, 상어의 간 등에 분포되어 있는 물질로 특히, 인체 적꿀수나 모유에 높은 농도로 존재하며, 주성분은 stearyl alcohol이 에테르결합을 하고 있는 batyl alcohol, palmitoxl alcohol이 에테르결합을 하고 있는 chimyl alcohol, oleyl alcohol이 에테르결합을 하고 있는 selachyl alcohol로 구성되어 있다(26-29). AG는 대식세포의 식균 작용을 활성화시키고 종양세포의 증식에 필요한 protein kinase C를 저해시키는 작용을 가지고 있다(30). 또한, 암환자나 방사선 관련 조직의 피해를 경감시키는 데 임상적으로 이용하고 있다(31).

Candida albicans(이하, *C.albicans*)은 인체 장관계에서 흔히 관찰할 수 있는 곰팡이성 병원균(fungal pathogen)으로 *Candida*속 진균 중에서도 병원성이 강하고 사람과 동물의 급성 및 만성 전신감염증에서 가장 흔히 발견되는데, 이 병원균은 숙주체에 기생하면서 피부, 위장관계, 구강 점막, 질저막 등에 있으면서 숙주 세포의 항상성 변화, 신경결핍, 외상, AIDS, 백혈병, 백혈구결핍 등의 증상을 유발시킨다(32-36).

본 연구에서는 *C.albicans*에 의해 유도된 급성 염증 반응 시 유도 되는 사이토카인의 발현에 관한 SQ와 AG의 효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7세포주는 한국세포주은행(KCLB, KOREA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium(이하, DMEM이라 함, Wel GENE Inc, KOREA)에 10% fetal bovine serum(이하, FBS라 함, Wel GENE Inc, KOREA), 100 μ mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

공시균주

Candida albicans(*C.albicans*) NIH A-207는 임선영 교수

(전남대학교, 광주)로부터 공급받아 사용하였다. *C.albicans*는 Sabouraud dextrose broth(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD)에서 교반을 하면서 28°C에서 배양하였다. 24시간 배양 후 세포들은 2,000 \times g에서 원심분리하여 수확하였고 Phosphate buffer saline(이하, PBS라 함)를 이용하여 2회 세척하였으며 원하는 농도(1×10^5 /mL)로 희석하여 사용하였다.

시약

DMEM(WelGENE Inc, KOREA), FBS(Wel GENE Inc, KOREA), LDH 측정 kit는 Roche사(U.S.A), Antibody는 Santa Cruz(U.S.A), TNF- α , IL-6에 대한 단클론항체(monoclonal antibody)의 ELISA kits(R&D systems, MIN, U.S.A)를 사용하였다.

실험군 설정

RAW 264.7 세포주에 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액 단독 처리 시 LDH, NO, TNF- α , IL-6 발현 효과: 실험군은 다음과 같다. 실험군 1은 RAW 264.7 세포주(5×10^4 /mL) 단독 배양한 군, 실험군 2는 RAW 264.7 세포주에 0.1% SQ를 처리한 군, 실험군 3은 RAW 264.7 세포주에 0.1% alkoxy glycerol를 처리한 군, 실험군 4는 RAW 264.7 세포주에 Batyl 용액(1 mg/mL)을 처리한 군, 실험군 5는 RAW 264.7 세포주에 Chimyl 용액(1 mg/mL)을 처리한 군 등으로 각각의 실험군 별로 12 well plate에 6, 24시간 배양한 후 각각을 측정하였다.

RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*을 처리한 후, SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액을 동시에 처리한 경우 TNF- α , IL-6 발현 효과: 실험군은 다음과 같다. 실험군 1은 RAW 264.7 세포주(5×10^4 /mL)에 *C.albicans*(3×10^5 /mL)를 처리해 배양한 군, 실험군 2는 RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*를 처리한 후, 0.1% SQ를 동시에 처리한 군, 실험군 3은 RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*를 처리한 후, 0.1% alkoxy glycerol를 동시에 처리한 군, 실험군 4는 RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*를 처리한 후, Bathy 용액(1 mg/mL)를 동시에 처리한 군, 실험군 5는 RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*를 처리한 후, Chimyl 용액(1 mg/mL)을 동시에 처리한 군 등으로 각각의 실험군 별로 12 well plate에 6, 24시간 배양한 후 각각을 측정하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH) 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 LDH 활성을 측정하여 정량화 하였다. 실험방법은 Supernatant 100 μ L를 취해서 96-well microplate에 분주하였다. Kit(Roche, Indianapolis, USA)에 있는 Reaction mixture를 각 well에 100 μ L씩 주입한 후, 30분 이상 실온에서 차광 상태에서 보관하면서 반응시켰다. Microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

NO 생성량 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 NO의 양은 세포 배양

액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로써 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent(0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthyethylene) diamine in 0.5 N HCl, Sigma) 100 μ L를 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate(0.5~100 M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

Cytokines의 측정

TNF- α , IL-6 등의 사이토카인 측정 방법은 manufacturers instruction에 따랐다. 먼저, 50 μ L 분석 희석액(assay diluent)을 제공된 well에 각각 넣고, 각 사이토카인에 대한 표준액(standard solution)과 실험액을 각각 50 μ L씩 well의 중심부에 첨가하여 잘 섞이도록 plate를 가볍게 바닥에 두들긴 다음 제공된 밀폐용 테이프를 덮어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 밀폐용 테이프를 제거하고 제공된 washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 측정하고자 하는 사이토카인의 conjugate 용액 100 μ L를 각 well에 넣고 밀폐용 테이프를 덮어 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 100 μ L 기질용액(substrate solution)을 각 well에 넣고 30분 동안 실온에서 차광 상태로 보관하면서 반응시켰다. 그 후, 정지용액(stop solution)을 각 well에 100 μ L씩 넣고 30분 이내에 측정하였다(micro-reader: 450 nm, wavelength correction: 570 nm).

단백질 함량 측정

단백질 농도는 Bicinchoninic acid protein assay kit(이하, BCA, USA)를 이용하여 분석하였다. 소혈청알부민(BCA)을 표준물질로 사용하여 각각의 단백 시료 25 μ L를 96 well plate에 분주하고 시약 A와 시약 B(50:1)로 구성된 BCA 약물(200 μ L)을 각각 첨가한 후, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

각 실험군 별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 프로그램인 SAS를 이용한 ANOVA test에 의하여 검정하였으며, 각 p값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

결과 및 고찰

RAW 264.7 세포주에 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액 단독 처리 시 LDH, NO, TNF- α , IL-6 발현 효과

RAW 264.7세포에 SQ, AG 및 AG의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가·배양한 후, LDH를 관찰한 결과, 배양액만 단독으로 처리한 정상군에 비해 실험에 관련된 용액을 함께 처리한 군의 경우 차이를 보이지 않았으

나, *Calbicans*을 세포에 처리한 군은 높은 LDH 생산이 관찰되었다(Fig. 1).

RAW 264.7세포에 SQ, AG 및 AG의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가·배양한 후, NO, TNF- α , IL-6의 발현량을 배양 6, 24시간 후에 각각 관찰하였다. NO의 경우 6, 24시간 배양 후 정상군에 비해서는 약간의 증가 경향을 보였으나, *Calbicans*의 단독 처리군에 비해 거의 차이를 나타내지 않아 이들 물질이 NO 생산에는 효과가 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). TNF- α 의 경우 배양 6시간째 군에서는 발현량에 특별한 변화가 없었으나, 24시간째 군에서는 Batyl, Chimyl 용액을 첨가한 군에서 정상군에 비

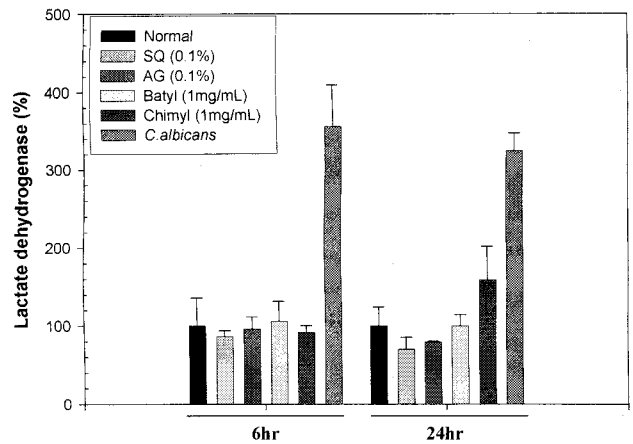


Fig. 1. Analysis of cytoprotective effect of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL).

The cytoprotective effects was analyzed with the amount of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well). Each groups were cultured during the 6 or 24 hours. After incubation, each medium was placed on to the 96 well plate and measured in ELISA reader at 490 nm. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment.

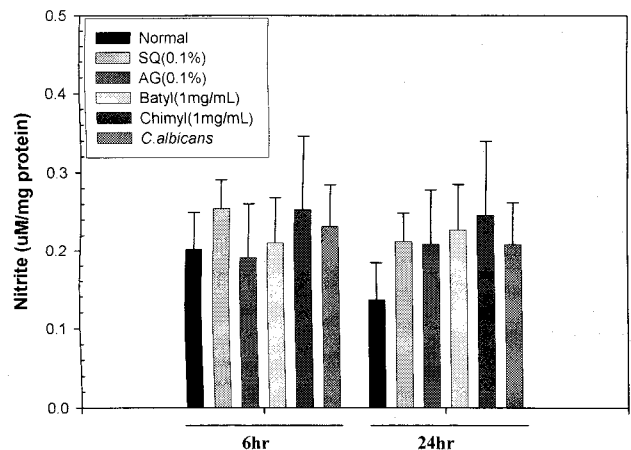


Fig. 2. The effects of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL) on the NO production in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well).

Each groups were cultured during the 6 or 24 hours. Nitrite concentration were expressed as μ mol/mg of protein. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment.

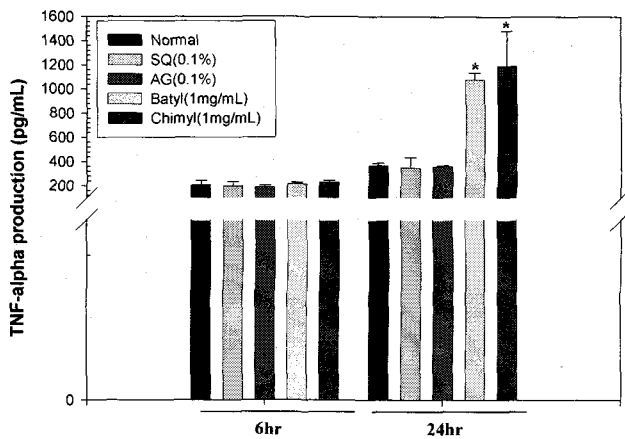


Fig. 3. The effects of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL) on the TNF- α expression in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well). Each groups were cultured during the 6 or 24 hours. And TNF- α released into the culture medium was assay by ELISA kit. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment. Statistically significant value compared with normal data by ANOVA test (*p<0.05).

해 발현량이 증가하는 경향을 보여 두 용액이 TNF- α 발현에 영향을 주는 것으로 보인다(Fig. 3). IL-6L의 경우 배양 6시간째 군에서는 정상군에 비해 큰 변화는 관찰할 수 없었고, 24시간째 군에서는 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액을 첨가한 군에서 모두 발현량이 정상군에 비해 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 4).

RAW 264.7 세포주에 *C.albicans*을 처리한 후, SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액을 동시에 처리한 경우 TNF- α , IL-6 발현 효과

TNF- α 발현량 변화에 관한 실험의 경우 *Calbicans*을 세포에 단독 처리한 군의 경우 TNF- α 발현량이 6, 24시간 모두 급격히 증가하는 경향을 보였다. 그러나, 6시간째 군에서는 SQ, AG, Batyl, Chimyl 등 각각의 용액을 *Calbicans*와 함께 처리한 군은 *Calbicans* 단독 처리군에 비해 발현량을 현저히 감소시켰고(Fig. 5), 24시간째 군에서는 Batyl, Chimyl 용액만 발현량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

IL-6 발현량 변화에 관한 실험의 경우 *Calbicans*을 세포에 단독 처리한 군과 SQ, AG, Batyl 등의 물질을 함께 첨가·배양한 후, 6시간째 경과 군에서는 큰 차이를 관찰할 수 없었으나, 통계학적으로 유의성을 가지고 있는 것은 Chimyl 용액을 함께 처리한 군이고(Fig. 6), 24시간째 군에서는 모든 실험군에서 *Calbicans*을 세포에 단독 처리한 군에 비해 통계학적으로 유의한 감소 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

Sung 등(37)은 홍삼 및 백삼 사포닌(50~500 μ g/mL)을 각각 일차배양 교세포(gial cells)에 첨가한 후, 세포독성을 관찰을 위해 LDH를 측정된 결과 홍삼 사포닌 50~100 μ g/mL, 백삼사포닌 50~200 μ g/mL에서 LDH가 대조군(10.4%)에 비해 적게 유리되었다(4~9%)고 보고하였다. 본 연구에

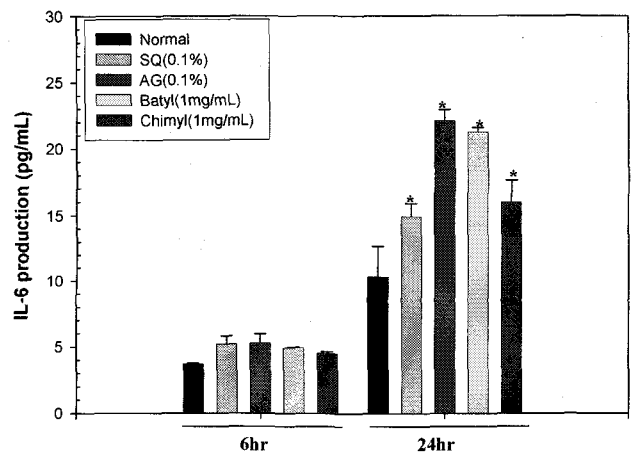


Fig. 4. The effects of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL) on the IL-6 expression in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well). Each groups were cultured during the 6 or 24 hours. And IL-6 released into the culture medium was assay by ELISA kit. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment. Statistically significant value compared with normal group data by ANOVA test (*p<0.05).

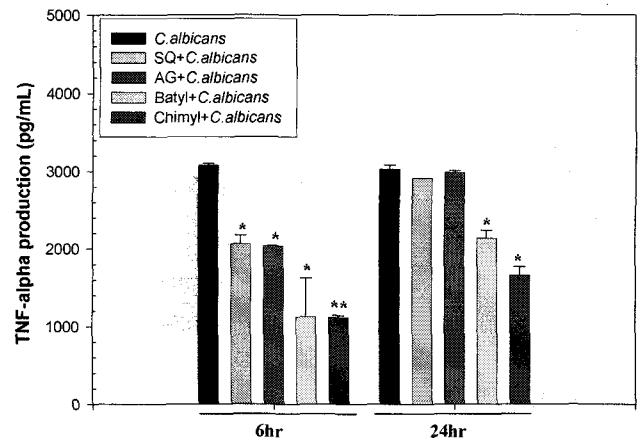


Fig. 5. The effects of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL) on the *Calbicans*-induced TNF- α expression in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well). Each groups were cultured during the 6 or 24 hours after treated with *Calbicans* (3×10^5 /mL). And TNF- α released into the culture medium was assay by ELISA kit. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment. Statistically significant value compared with only treated with *Calbicans* group data by ANOVA test (*p<0.05, **p<0.01).

서는 RAW 264.7 세포주에 SQ(0.1%), AG(0.1%) 그리고 AG의 주요 성분인 Batyl(1 mg/mL), Chimyl(1 mg/mL) 용액을 6, 24시간 동안 각각 처리하여 배양한 후, LDH를 관찰하였는데, 각 실험에 사용한 용액이 정상군에 비해 오차 범위 안에 들어 있기 때문에 독성이 없는 것으로 생각되어진다(Fig. 1). 그러나, *Calbicans* 단독처리 군의 경우는 LDH가 크게 증가한 것을 관찰할 수 있어 세포 독성을 유발한다는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1 참조).

Yee 등(38)은 RAW 264.7 세포주에 LPS(1 μ g/L) 유도

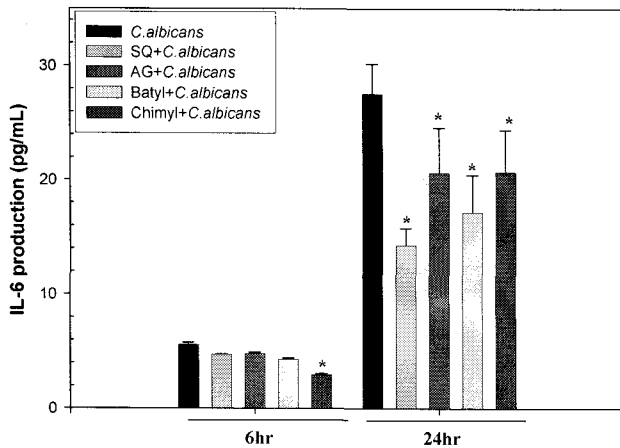


Fig. 6. The effects of SQ (0.1%), AG (0.1%), Batyl (1 mg/mL) or Chimyl (1 mg/mL) on the *C. albicans*-induced IL-6 expression in cultured RAW 264.7 cells (5×10^4 /well).

Each groups were cultured during the 6 or 24 hours after treated with *C. albicans* (3×10^5 /mL). And IL-6 released into the culture medium was assay by ELISA kit. The results are expressed the mean \pm SD (n=10) in the triplicate experiment. Statistically significant value compared with only treated with *C. albicans* group data by ANOVA test (* $p < 0.05$)

염증 반응을 유발시킨 후, 오가피(1~100 μ g/mL)를 첨가하여 배양한 후 NO 생성량을 관찰한 결과 10, 100 μ g/mL을 첨가해 준 군에서 NO 생성량이 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 *C. albicans*(3×10^5 /mL)을 RAW 264.7 세포주에 첨가하여 NO를 관찰하였는데, *C. albicans* 처리군에 대해 SQ(0.1%), AG(0.1%) 그리고 AG의 주요 성분인 Batyl(1 mg/mL), Chimyl(1 mg/mL) 용액이 큰 차이를 보이지 않아 본 실험에 사용한 농도가 NO 생성과는 관련이 없는 것으로 보여 NO 관련 추후 실험의 경우 농도가 중요할 것으로 생각된다(Fig. 2 참조).

Han 등(4)은 쿠파세포에 β -1,3 glucan 성분을 첨가하여 배양한 경우 β -1,3 glucan 성분의 농도 증가에 비례하여 NO와 TNF- α 의 양적 증가를 유발시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액을 대식세포(RAW 264.7)에 첨가한 후 6, 24시간 동안 배양한 결과 6시간째에는 별다른 차이가 관찰되지 않았지만, 24시간째에 Batyl, Chimyl 용액이 TNF- α 의 발현을 증가하는 것으로 보아 실험 용액 단독 처리의 경우에도 TNF- α 발현에 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 3 참조).

*V. vulnificus*에 오염된 경우 초기에 다량의 TNF와 IL-6가 분비되어진다(39). TNF- α , IL-6는 정상세포(astrocyte)에서 IFN- γ 나 LPS 단독 자극에 의해서는 TNF- α 생성이 증가하지 않으나, *M. pneumoniae* 항원이나 B-16 흑색종세포로 자극 시 증가하는 경향을 보인다(40). 본 연구에서는 *C. albicans*(3×10^5 /mL)을 RAW 264.7 세포주에 단독으로 첨가하여 배양한 결과 TNF- α , IL-6 발현이 다량 증가하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 5, 6 참조).

Byun 등(41)은 현삼(玄蔘, *Scrophularia buergeriana* Miq)

의 메탄올 추출액(SRE)을 RAW 264.7 세포주에 농도별(0.1, 0.3 mg/mL)로 5, 12, 18, 24시간 동안 각각 처리한 후, LPS (lipopolysaccharide)로 유도된 TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO 생성에 미치는 연구를 통해 LPS의 경우 TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO 등이 모두 증가하였으나, 현삼 추출액은 TNF- α , IL-1 β , NO의 경우는 유의하게 감소시키는 효과가 있었으나, IL-6 분비에는 효과가 없다고 보고하였다. 본 실험에서는 *C. albicans*로 유도된 TNF- α , IL-6 등이 배양 시간에 따라 생성되는 경향이 달랐으며, 실험에 사용한 각각의 용액 등은 *C. albicans*로 유도된 TNF- α , IL-6 생성을 유의하게 감소시키는 효과를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

본 연구를 통해서 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액 등이 *C. albicans* 유도로 증가된 TNF- α , IL-6와 같은 사이토카인의 조절에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 대식세포인 RAW 264.7 세포주에 SQ (0.1%), AG(0.1%), Batyl(1 mg/mL), Chimyl(1 mg/mL) 용액 등을 단독 혹은 *C. albicans*와 함께 첨가하여 배양한 후 LDH, NO, TNF- α , IL-6 발현에 어떤 영향을 주는 지를 관찰하였다. 모든 실험군에서 실험에 사용한 농도는 LDH, NO 생산에 영향을 주지 못하였다. 실험에 사용한 용액을 단독 처리한 실험의 경우 TNF- α 와 IL-6 발현의 경우 6시간째에는 큰 차이를 나타내지는 못하였으나, 24시간째에는 발현에 영향을 주었다($p < 0.05$). *C. albicans*을 함께 처리한 실험의 경우에는 *C. albicans* 단독 처리군에 비해 실험 용액을 함께 처리한 군에서 *C. albicans* 유도 TNF- α 와 IL-6 발현을 감소시키는 효과를 관찰하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$). 본 연구를 통해 SQ, AG, Batyl, Chimyl 용액이 *C. albicans* 유도에 의해 감소된 면역반응을 증가시킬 수 있을 것으로 생각되어진다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 세모스쿠알렌의 지원을 받아 연구되었음.

문 헌

- Jeong KH, Lee SH, Lee YJ, Kim MJ, Ko KP, Oh SJ, Woo JT, Kim YS. 2004. Association of the tumor necrosis factor- α gene polymorphism with end-stage kidney failure. *Kor J Nephrol* 23: 439-445.
- Hur GM, Park GA. 2004. TNF receptor signaling at the angle of cell death. *Biochem Mol Biol News* 12: 275-282.
- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel D, Harkins RN. 1985. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 260: 2345-2354.

4. Han MD, Lee JW, Jeong H, Kim YS, Ra SJ, Yoon KH. 1999. Nitric oxide, TNF- α and TGF- β formation of rat kupffer cell activated by the β -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 27: 28-34.
5. Agarwal S, Drysdale BE, Shin HS. 1988. Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involved ADP-ribosylation. *J Immunol* 140: 4187-4192.
6. Vicek J, Lee TH. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266: 7313-7316.
7. Beutler B, Cerami A. 1989. The biological of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7: 625-655.
8. Eigler A, Sinh B, Hartmann G, Endres S. 1997. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokines. *Immunol Today* 18: 487-492.
9. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga Y, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324: 73-76.
10. Stavros F, Evdokia K, Eleni D, Marcella R, Renato CB, Anthony T, Pio C. 1996. Generation of TNF α , IFN γ , IL-6, IL-4 and IL-10 in mouse serum from trichinellosis: effects of the anti-inflammatory compound 4-deoxypyridoxine (4-DPD). *Immunol Letters* 49: 179-184.
11. Steven M, Vera A. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-1172.
12. Barton BE. 1997. IL-6: insights into novel biological activities. *Clin Immunol Immunopathol* 85: 16-20.
13. Van Snick J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: 253-278.
14. Tilg H, Trehu E, Atkins MB. 1994. Interleukin-6 as an anti-inflammatory cytokines: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p 55. *Blood* 83: 113-118.
15. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235: 473-476.
16. Stuehr DJ, Nathan CF. 1989. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555.
17. Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U, Klockgether T. 1998. Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide. *J Neurochem* 71: 88-94.
18. Liu GCK, Ahrens Jr EH, Screibman PH, Crouse JR. 1976. Measurement of squalene in human tissues and plasma. *J Lipid Res* 17: 38-45.
19. Kohno Y, Egawa Y, Itoh W, Nagoka S, Takahashi M, Mukai K. 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochem Biophys Acta* 1256: 52-56.
20. Budiarto IT. 1990. Fish oil versus olive oil. *Lancet* 336: 1313-1314.
21. Kim JS, Yoon JS, Choi YB, Choi KP, Kim JS, Chung SM. 1999. Healing effects of squalene on the epidermis in burned mouse. *Kor J Electron Microscopy* 29: 163-175.
22. Kim JS, Yoon JS. 2000. Effects of squalene on mouse liver toxicity with cadmium. *Kor J Electron Microscopy* 30: 141-152.
23. Yamawaki M, Azuma I, Saiki I, Uemiyama M, Aoki O, Ennyu K, Yamamura Y. 1978. Antitumor activity of squalene-treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice. *Gann* 69: 619-629.
24. Storm HM, Oh SY, Kimler BF, Norton S. 1993. Radioprotection of mice by dietary squalene. *Lipid* 28: 555-559.
25. Kim YH, Lee JH, Kim JS, Choi YB. 2005. Effects of squalene on basic fibroblast growth factor (bFGF) from the renal proximal tubules *in vivo*. *Kor J Gerontol* 15: 26-31.
26. Hallgren B, Larsson S. 1962. The glyceryl ethers in the liver oils of elasmobranch fish. *J Lipid Res* 3: 31-38.
27. Hallgren B, Larsson S. 1962. The glyceryl ethers in man and cow. *J Lipid Res* 3: 39-43.
28. Blomstrand R, Ahrens EH. 1959. Absorption of chymyl-alcohol in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 100: 802-805.
29. Brohult A. 1963. Alkoxyglycerols and their use in radiation. *Acta Radiologica (Suppl)* 223: 7-19.
30. Robinson M, Burdine R, Warne T. 1996. Inhibition of phorbol ester-stimulated arachidonic acids release by alkylglycerols. *Biochim Biophys Acta* 1254: 361-367.
31. Brohult A. 1960. Alkoxyglycerols as growth-stimulating substances. *Nature* 188: 591-592.
32. Luigina R, Antonella M, Elio C, Roberta S, Carlo T, Paolo P, Francesco B, Valeria P. 1996. Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 183: 1345-1355.
33. Jose LL, Manuel C, Amelia M, Jose PM. 2004. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *Immunol Microbiol* 41: 187-196.
34. Kwon YB. 1994. Pathological studies on experimental nephritis induced by *C. albicans* in mice. *Kor J Lab Ani Sci* 10: 177-184.
35. Aitor R, Roberto GT, Maria JS. 1995. Nitric oxide-dependent killing of *Candida* by murine peritoneal cells during an experimental infection. *Immunol Med Microbiol* 11: 157-162.
36. Kim HK, Lee JH, Shim JK, Han YM. 2005. Anticandidal activity of the protein substance from *Coptidis rhizoma*. *Yakhak Hoeji* 49: 323-329.
37. Sung JH, Choi DH, Kim DH, Chun BG, Choi SH. 2004. White ginseng saponin upregulated the production of TNF- α , IL-1 β , and NO in primary cultures of mixed glial cells. *J Ginseng Res* 28: 120-126.
38. Yee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 29: 342-348.
39. Park SD, Kim JS, Cha SH. 1998. Changes of serum cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) in toxemic mice induced by *Vibrio vulnificus* cytotoxicity. *Kor J Dermal Sci* 36: 23-29.
40. Kim TY, Jeon BC, Lee HD, Chang MW. 2001. Effects of B-16 melanoma cells and *Mycoplasma pneumoniae* on the induction of IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α from mouse astrocytes. *J Bacteriol Virol* 31: 1-10.
41. Byun SH, Yang CH, Kim SC. 2005. Inhibitory effects of scrophulariae radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide activated RAW 264.7 cells. *Kor J Herbol* 20: 7-16.

(2005년 9월 23일 접수; 2005년 11월 23일 채택)