

마우스에 있어서 Doxycycline의 免疫毒性에
미치는 Ethanol의 影響

安 榮 根·金 正 勳·鄭 址 乾

圓光大學校 藥學大學

Effect of Ethanol on the Immunotoxicity
of Doxycycline in Mice

Young Keun Ahn, Jung Hoon Kim and Zi Gun Chung

College of Pharmacy, Won Kwang University

ABSTRACT

Experiments were performed on mice to investigate the influences of doxycycline and ethanol on the immune responses. Doxycycline was injected intraperitoneally and ethanol was administered in the drinking water. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells. Immune responses were evaluated by humoral immunity, cellular immunity, peripheral circulating white blood cell and phagocyte activity. Pathotoxicological influences were measured by serum protein and albumin. The weight of spleen, thymus and liver were measured.

Doxycycline and ethanol combined administration decreased the weight of thymus and spleen.

Humoral and cellular immune response were reduced by doxycycline administration.

Especially ethanol combined administration significantly reduced humoral and cellular immune response. Phagocyte activity was increased by ethanol combined administration and peripheral circulating white blood cell was significantly increased by ethanol administration.

Ethanol combined administration decreased serum A/G ratio.

緒 論

Ethanol은 消毒劑, 溶媒, 燃料, 合成原料로 利用되고 또한 藥物으로써도 가장 오래된 *tranguizer*로 應用되었다. 그러나 Ethanol은 肝細胞의 smooth endoplasmic reticulum을 增加시켜 肝에서의 藥物代謝를 增加시키므로 肝臟害의 原因과 關係가 있다는 事實은 이미 1700年代 後半에서부터 잘 알려져 있다^{1,2)}.

또한 Ethanol은 胃·腸管을 통하여 吸收된 다음 주로 肝에서 酸化酵素인 cytosolic alcohol dehydrogenase와 mitochondrial aldehyde dehydrogenase에 의한 酸化作用을 받아 代謝되며, 腎臟, 筋肉 및 肺에서도 少量이 代謝된다고 報告되고 있다. 이러한 alcohol 代謝는 NADH를 증가시켜 NADH/NAD의 比의 增加로 인하여 代謝障害의 주요 因子인 acetaldehyde의 양을 增加시킨다고 하였다³⁾.

Mcfarland 등은 알콜중독자에게 顆粒球減少症과 淋巴球減少症이 發現한다고 報告 하였으며⁴⁾ Magdalena 등은 알콜성 肝硬變症患者는 Rosette forming cells (RFC)수가 顯著히 減少한다고 報告 하였다⁵⁾. 또한 Loose 등에 의하면 rat에 만성적으로 ethanol을 投與하였을 때 1次 體液性免疫이 減少된다고 報告하였고⁶⁾, Tennebaum 등은 遲延型過敏反應의 低下, 胸腺과 脾臟의 萎縮을 招來하고 2次 體液性免疫을 抑制한다고 報告하였으며⁷⁾ Tapper 등은 감염의 發生頻度を 增加시키고 또한 惡化시킨다고 報告하였다⁸⁾.

Doxycycline (α -b-deoxy-5-oxytetracycline)은 methacycline을 수소화한 半合成 tetracycline系 抗生物質로 그람양성, 그람음성, 리켓치아 및 아메바 등에 有效한 經구용 抗生劑로서 과민증상은 allergy, 혈관신경부종, 아나필락시스, 심막염이 있고 혈관증상으로는 용혈성 빈혈, 혈소판 감소, 호중구감소 및 호산구증다증이 알려져 있다.

Doxycycline은 低濃度에서 B lymphocyte와 T lymphocyte의 유사분열반응에 대한 抑制作用과 in

vitro에서 抗體生産의 減少를 報告하였으며⁹⁾ Gnarpe 등은 大食細胞의 活性을 減少시킨다고 報告하였고¹⁰⁾ 最近에 Martin 등 및 Forsgren 등은 Doxycycline이 多型核 白血球의 遊走能이 低下된다고 報告하였다^{11,12)}.

反應에 미치는 影響에 대하여는 여러가지 理論이 있는 것으로 思料되며, 또한 alcohol性 飲料 및 工業原料로 쓰이고 있는 ethanol이 藥物의 代謝 및 生體防禦에 影響을 미치므로 doxycycline 單獨投與와 ethanol의 併用投與가 免疫反應에 미치는 影響이 있을 것으로 思料되어 本 實驗을 實施하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

體重 20 g 前後의 ICR male mouse를 市販飼料로 1週間 給食하여 適應시킨 後에 20마리를 1群으로 하여 모두 7群으로 分類하여 온도 23±2°C 유지되는 사육실에서 2週間 飼育하였다.

2. Doxycycline의 調製 및 投與

Doxycycline(중의제약)를 평균증류수에 溶解하여 體重kg當 4 mg, 8 mg, 16 mg을 2週間 1日 1回 一定한 時間에 腹腔內 注射하였다.

3. Alcohol 溶液의 調製 및 投與

Ethanol(Duksan pharmaceutical Co. LTD)을 증류수에 溶解시켜 4% ethanol로 한 뒤 飲水케 하였다.

4. 體重 및 臟器의 重量 計測

1) 體重: 實驗動物의 體重은 doxycycline hylate 溶液 및 ethanol 投與 開始日과 最終 藥物投與日 2日 後에 測定하였다.

2) 臟器 重量: 實驗動物의 頸動脈을 切斷 採血한 後 脾臟, 胸腺 및 肝臟을 各各 摘出하여 그 外觀을 觀察하고 그 重量을 測定, 對體重 百分比를 求하였다.

5. 抗原의 調製 및 免疫

1) 抗原 : 本 實驗에서는 緬羊赤血球(Sheep red blood cell : 以下 S-RBC)를 使用하였다. 그 方法은 雄性 緬羊의 頸動脈으로 부터 heparin을 처리한 注射器로 採血한 後 동량의 Alserver氏 液(pH 6.1)을 加하여 4°C에서 保存하여 2週日 以內에 使用하였다. 保存 中인 S-RBC를 使用할 때에는 使用 直前 PBS로 3回 遠心洗滌한 後 1×10^8 S-RBC/ml을 濃度로 Hank's balanced salt solution (以下 HBSS)에 浮遊시켜 使用하였다.

2) 免疫 : 上記 抗原 浮遊液 0.1 mg(1×10^7 S-RBC)를 Reed 等의 報告를 參考하여¹³⁾ mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施한 4日 後에 mouse 左側後肢足蹠皮內에 2×10^8 S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml(1×10^8 S-RBC)를 注射하여 惹起시켰다.

6. 赤血球 凝集素價 및 溶血素價의 測定^{13,14)}

1) 血清의 分離 및 非動化

Mouse의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採取 凝固시킨 後에 遠心分離하여 血清을 分離하고 56°C에서 30分間 非動化시킨 後 4°C에서 保存하여 使用하였다.

2) 赤血球 凝集素價(Hemagglutination titer : 以下 HA titer)의 測定

S-RBC의 凝集素價를 microtitration (Nunclon micro test tray)를 使用하여 다음과 같이 實施하였다. 즉 各 實驗動物로부터 얻은 個個의 非動化 血清을 各 well에 PBS로 2倍 系列로 稀釋한 後 PBS에 浮遊한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 混合한 다음 37°C에서 18시간 放置하여 赤血球의 凝集 類型을 觀察 判讀하였으며 凝集을 일으키는 血清의 最高稀釋度를 그 血清의 凝集素價로 하였다.

3) 赤血球 溶血素價(Hemolysin titer : 以下 HY titer)의 測定

S-RBC의 量 및 血清의 稀釋은 凝集素價 測定時와 同一하게 實施하였으며 S-RBC와 稀釋하여 들어 있는 各 well에 guinea pig complement를 20倍로 稀釋하여 0.025 ml씩 加한 다음 37°C에서 1시간 放置하여 溶血 여부를 觀察하였다. 이 때에 完全 血清

을 일으키는 最高稀釋度를 그 力價로 判讀하였다.

7. 足蹠腫脹反應(Foot pad swelling test)

Arthus反應(immediate type hypersensitivity) 및 遲延型 過敏反應(delayed type hypersensitivity : 以下 DTH)를 測定하기 위하여 Garvey 等이 記述한 方法에 準하여¹⁴⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 1次免疫 4日 後에 S-RBC 0.05 ml(1×10^8)을 mouse의 左側後肢足蹠에 皮內注射하였다. 注射 後 一定 時間이 經過한 後 腫脹의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper로 測定하였으며 腫脹程度의 測定價는 測定에 따른 誤差를 避하기 爲하여 2回 測定한 數值를 平均하였다. 判讀의 基準은 Sugimoto 및 Elliott 等의 判讀基準에 따라^{15,16)} 3時間의 反應을 Arthus反應, 24時間 經過 後의 反應을 遲延型 過敏反應으로 看做하였다. 足蹠腫脹指數는 다음과 같이 表示하였다.

$$\text{Foot pad swelling Index} = \frac{\text{腫脹時 두께} - \text{正常 두께}}{\text{正常 두께}} \times 100$$

8. 脾臟細胞 浮遊夜의 調製

脾臟을 mouse로부터 無菌의으로 摘出하여 minimum essential medium (以下 MEM)에 조심스럽게 粉碎한 後 mylon mesh로 濾過하여 死細胞를 除去하였으며 寒冷 MEM으로 4°C에서 3回 遠心洗滌한 後 脾臟細胞가 2×10^7 cell/ml가 되도록 PBS에 浮遊하였다. 每 實驗 때마다 이 檢査는 trypan blue dye exclusion method으로 다음과 같이 하였다. 즉 試驗管에 0.3 ml의 細胞浮遊液을 넣은 後 0.1 ml의 trypan blue dye solution을 加하여 5分間 經過 後 血球計算板에서 無色 生細胞와 青色으로 染色된 死細胞의 數를 센 後 그 百分率로 計算하였다¹⁴⁾.

9. 脾臟細胞의 Rosette 形成細胞(RFC)의 檢出

脾臟細胞의 Rosette 形成細胞의 檢査는 Elliott 等이 記述한 方法에 準하여¹⁶⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 脾臟細胞 浮遊夜 0.25 ml(5×10^6 cell)와 S-RBC 浮遊夜 0.25 ml(5×10^7 cell)를 試驗管에 넣

고 혼합하여 200×g에서 12분간 원심분리한 후 이 재부유액 1滴을 血球計算板에 떨어뜨리고 RFC를 檢鏡 觀察하였다. 檢鏡 時 脾臟細胞에 S-RBC가 3個 以上 부착한 細胞를 RFC로 判定하여 다음 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{RFC} = \frac{\text{Number of Rosett forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

10. 大食細胞의 活性檢査

大食細胞의 食食能力을 測定하고자 本 實驗에서는 Biozzi 등이 記述한 方法에 準하여¹⁷⁾ 다음과 같이 實施하였다. 즉 最終 實驗藥物 投與日 2日 後에 carbon 즉 rotring ink를 滅菌증류수에 녹인 1% gelatin액으로 稀釋하여 현탁액을 調製하여 本 實驗期間 동안 調製한 colloid 狀 炭素현탁액을 mouse 體重 g당 0.01 ml씩 mouse의 尾靜脈內로 注射하였다. 그 後에 mouse의 眼窩後部靜脈血管叢(retro-orbital plexus)를 calibrated heparinized capillary tube (20 μl: microhemocrit)를 穿刺하여 20 μl의 血液을 10分, 20分, 30分 間隔으로 採取하고 採取 血液 sample을 0.1% sodium carbonate(증류수에 溶解한 溶液) 溶液 2 ml가 든 vial에 各各 옮겨서 赤血球가 溶解되도록 잘 混和하였다. 이어서 吸光度를 600 nm에서 測定하고 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

Corrected phagocytic index

$$= \frac{W_B^c}{W_A^s + W_L^b} \times \sqrt[3]{K}$$

W_B^c : 體重

W_A^s : 脾臟의 重量

W_L^b : 脾臟의 重量

K: Phagocytic coefficient (測定 농도의 10倍數를 log로 轉換하고 時間에 對하여 plot한 graph 曲線)

11. 末稍循環 白血球數의 測定

Mouse의 眼球靜脈叢으로부터 末稍血液을 採取하여 türk액으로 희석하여 血球計算板上에 滴下한 後 赤血球 總數를 測定하였다.

12. 生化學的 檢査

2) 血清總蛋白의 測定

血清 0.02 ml를 取하여 Biuret 法에 依하여 다음과 같이 測定하였다¹⁸⁾. 즉 試驗管 A에 血清 0.02 ml를 取하고 試驗管 S에 標準夜(7 g/dl albumin) 0.02 ml를 取하여 各 管에 發色試藥(total protein color reagent: Biuret reagent) 40 ml를 加하여 混和한 다음 30分 後(3時間以內)에 發色試藥을 對照로 하여 545 nm에서 各各의 吸光度 E_A , E_S 를 測定하였다. 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{總血清蛋白濃度} = E_A/E_S \times 7 \text{ g/dl}$$

2) 血清 Albumin의 測定

BCG에 依한 albumin 定量法에 準하여 測定하였다¹⁷⁾. 즉 血清을 試驗管 A에 取하고 標準夜 0.025 ml(4 g/dl albumin)을 試驗管 S에 取하고 試驗管 A, S에 發色試藥 5.0 ml(0.021% bromo cresol green in 0.057 M, pH 4.2 citrate buffer soln. Brij. 35)를 加하여 混合, 25°C 30分間 放置한 後 發色試藥을 對照로 하여 630 nm에서 比色, 各各의 吸光度를 E_A , E_S 로 하고 다음의 公式에 準하여 計算하였다.

$$\text{血清 albumin濃도} = E_A/E_S \times 4 \text{ g/dl}$$

통계분석: 모든 data의 有意性 검정은 student's t-test로 行하였다.

實驗 結果

Mouse에 있어서 doxycycline 단독 投與와 ethanol 公용 投與時 緬羊 赤血球 抗原에 對한 免疫反應은 다음과 같다.

1. 體重, 脾臟, 胸腺 및 肝臟의 重量變化

1) 體重的 變化

實驗 開始日 및 藥物投與 2週後 測定한 體重 및 體重的 증가율은 Table 1과 같이 doxycycline 단독 投與群은 正常 對照群에 比하여 그 증가율은 약간 증가 하였으나 ethanol 併用投與群에서는 유의하게 低下되었다.

Table 1. Effects of doxycycline and ethanol on the body weight in mice.

Group	Initial wt. (gm)	Final wt. (gm)	Increasing rate (%)
Normal	19.83±0.30	26.60±0.83	33.33±2.82
Doxy. 4 mg/kg	18.16±1.14	24.41±2.83	34.81±6.99
Doxy. 8 mg/kg	18.30±1.60	24.61±1.46	36.68±9.24
Doxy. 16 mg/kg	18.46±1.20	25.12±2.06	36.63±8.63
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	17.96±1.61	23.06±2.21	28.00±4.75**
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	18.10±1.34	24.27±1.07	30.19±8.18
Doxy 16 mg/kg+EtOH	18.51±1.03	23.64±1.57	27.78±5.60*

Doxycycline was administered intraperitoneally, and 4% ethanol was administered in the drinking water for 2 weeks.

Each value is the mean±S.D. Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

2) 肝臟의 重量

肝臟對 體重 重量比 變化는 Table 2에서 보는 바 같이 正常對照群이 5.43·0.24%인데 doxycycline 단독 投與群과 ethanol 併用投與群은 현저하게 減少하였다.

Table 2. Effects of doxycycline and ethanol on liver weight in mice.

Group	Liver wt (gm)	Liver wt. / Body wt. ×100(%)
Normal	1.10±0.06	5.43±0.24
Doxy. 4 mg/kg	1.06±0.15	4.35±0.29**
Doxy. 8 mg/kg	0.98±0.16*	4.14±0.84**
Doxy. 16 mg/kg	1.12±0.13	4.44±0.27**
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	1.01±0.13	4.41±0.58**
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	1.18±0.36	4.85±0.85
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	0.94±0.09**	3.98±0.20**

Doxycycline and ethanol were administered for 2 weeks.

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

3) 脾臟의 重量

脾臟對 體重 重量比 變化는 Table 3에서 보는 바 같이 正常對照群이 0.80±0.03%인데 比하여 全群에서 감소가 있었다. 특히 doxycycline 단독 投與群과 poxycycline 16 mg/dl에 ethanol 併用投與群은 현저한 減少가 있었다.

Table 3. Effects of doxycycline and ethanol on spleen weight in mice.

Group	Spleen wt. (mg)	Spleen wt / Body wt ×100%
Normal	165.56±10.26	0.80±0.03
Doxy. 4 mg/kg	122.90±20.60**	0.46±0.17**
Doxy. 8 mg/kg	136.60±45.99	0.55±0.18**
Doxy. 16 mg/kg	146.70±28.01	0.58±0.08**
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	135.60±43.57*	0.61±0.24*
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	180.30±62.60	0.75±0.28
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	130.60±33.28**	0.55±0.13**

Doxycycline and ethanol were administered for 2 weeks.

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

4) 胸腺의 重量

胸腺對 體重 重量比 變化는 Table 4에서 보는 바 와 같이 正常對照群이 0.25±0.01%인데 比하여 doxycycline 단독 投與群은 약간 減少하는 경향을 보 였으며 ethanol 併用 投與群에서도 減少가 있었다. 특히 doxycycline 16 mg/kg 단독 投與群과 ethanol 併用投與群에는 현저한 減少가 있었다.

2. 體液性 免疫反應에 미치는 영향

1) 赤血球 凝集素價 및 溶血素價

Doxycycline 및 ethanol을 2週間 投與한 後 緬羊

Table 4. Effects of doxycycline and ethanol on thymus weight in mice.

Group	Thymus wt. (mg)	$\frac{\text{Thymus wt.}}{\text{Body wt.}} \times 100\%$
Normal	50.10±3.37	0.25±0.01
Doxy. 4 mg/kg	58.00±10.32*	0.24±0.05
Doxy. 8 mg/kg	58.10±16.90	0.24±0.08
Doxy. 16 mg/kg	50.00±15.40	0.20±0.05**
Doxy. 4 mg/kg + EtOH	49.70±14.89	0.20±0.06**
Doxy. 8 mg/kg + EtOH	53.30±12.72	0.20±0.05**
Doxy. 16 mg/kg + EtOH	46.30±15.50	0.20±0.06**

Doxycycline and ethanol were administered for 2 weeks.

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

赤血球로 免疫하여 測定한 赤血球 凝集素價 및 溶血素價는 Table 5와 같다. 赤血球 凝集素價는 doxycycline 단독投與群 및 ethanol 併用投與群이 正常對照群인 4.00±0.10에 比하여 減少하였고 특히 doxycycline 4 mg/kg 단독投與群은 1.88±0.35로 현저한 減少를 보였다. 그리고 赤血球 溶血素價는 doxycycline 단독投與群 및 ethanol 併用投與群이 正常對照群인 3.14±1.24에 比하여 減少하였으며 특히 doxycycline 단독投與群과 doxycycline 4 mg/

Table 5. Effects of doxycycline and ethanol on antibody production in mice.

Group	HA titer (log ₂)	HY titer (log ₂)
Normal	4.00±0.10	3.14±1.24
Doxy. 4 mg/kg	1.88±0.35**	1.10±0.33**
Doxy. 8 mg/kg	2.00±0.53	1.75±0.71**
Doxy. 16 mg/kg	1.75±0.46	1.00±0.00**
Doxy. 4 mg/kg + EtOH	2.63±0.52	1.25±0.46**
Doxy. 8 mg/kg + EtOH	1.75±0.463	2.00±1.07*
Doxy. 16 mg/kg + EtOH	2.00±0.93	1.00±0.00**

Mice were challenged with 10⁸ S-RBC 4 days after sensitization. On 5 the day the HA and HY titer were assayed.

Each Value is the mean±S.D (log₂) of 8~10 mice.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

kg, 16 mg/kg에 ethanol 併用投與群에는 현저한 減少경향을 보였으며 doxycycline 8 mg/kg에 ethanol 併用投與群은 2.00±1.07로 유의한 減少가 있었다.

2) Arthus 反應

緬羊赤血球로 感作한 mouse에 2×10⁸ S-RBC를 左側後肢足蹠皮內 注射한 3時間 後 測定한 Arthus 反應은 Table 6과 같다. Doxycycline 단독投與群과 ethanol 併用投與群에서 減少의 경향을 보였으며 특히 doxycycline 4 mg/kg 단독投與群은 15.45±2.46으로 현저한 減少를 보였으며 doxycycline 8 mg/kg에 ethanol 併用投與群은 13.61±2.59로 유의한 減少가 있었다.

Table 6. Effects of doxycycline and ethanol on the Arthus reaction.

Group	Arthus reaction
Normal	15.81±1.40
Doxy. 4 mg/kg	15.45±2.46**
Doxy. 8 mg/kg	14.03±5.19
Doxy. 16 mg/kg	14.86±5.46
Doxy. 4 mg/kg + EtOH	14.61±3.49
Doxy. 8 mg/kg + EtOH	13.61±2.59*
Doxy. 16 mg/kg + EtOH	13.52±3.77

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10⁸ S-RBC.

Foot pad swelling index = $\frac{\text{swelling of foot pad}}{\text{thickness of foot pad}} \times 100$

At 4 hour FPSI was Arthus reaction.

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

3. 細胞性 免疫反應에 미치는 영향

1) 遲延型 過敏反應(DTH)

緬羊赤血球를 皮內注射 24時間 後 測定한 지연형 과민반응은 Table 7과 같다. 正常對照群이 9.54±0.68인데 比하여 全群이 減少하였다. 특히 doxycycline 8 mg/kg 단독投與群과 doxycycline 8 mg/kg에 ethanol 併用投與群은 6.05±1.77, 4.13±1.39로 현저한 減少를 보였고 doxycycline 16 mg/kg에

Table 7. Effects of doxycycline and ethanol on the delayed type hypersensitivity reaction.

Group	RTH
Normal	9.54±0.68
Doxy. 4 mg/kg	9.32±2.26
Doxy. 8 mg/kg	6.05±1.77**
Doxy. 16 mg/kg	8.69±1.98
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	7.69±3.48
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	4.13±1.39**
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	7.83±2.09*

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10⁸ S-RBC.

$$\text{Foot pad swelling index} = \frac{\text{swelling of foot pad}}{\text{thickness of foot pad}} \times 100$$

At 24 hour FPSI was DTH.

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

ethanol 併用投與群은 7.83±2.09로 유의한 감소를 보였다.

2) Rosette 形成細胞

Rosette 形成細胞數는 Table 8과 같이 正常對照群이 11.61±0.70인데 比하여 doxycycline 4 mg/kg 단독投與群인 11.19±1.04를 제외하고는 현저한 減少를 보였다.

Table 8. Effects of doxycycline and ethanol on Rosette forming cell in mice.

Group	RFC (%)
Normal	11.61±0.70
Doxy. 4 mg/kg	11.19±1.04
Doxy. 8 mg/kg	7.67±3.22**
Doxy. 16 mg/kg	8.36±3.46**
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	5.40±3.16**
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	6.06±1.37**
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	6.50±2.20**

$$\text{RFC (\%)} = \frac{\text{No. of Rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \% \text{ viability}} \times 100$$

Each value is the mean±S.D.

Significant difference from normal group. (**p<0.01)

4. 末稍循環 白血球 및 大食細胞 活性에 미치는 영향

1) 末稍循環 白血球

Doxycycline 및 ethanol을 2週間 投與한 後 mouse의 眼窩後部靜脈血管叢으로부터 血液을 채취하여 測定한 白血球數는 Table 9와 같다. 正常對照群이 10,080±250인데 比하여 doxycycline 단독投與群은 減少를 보였으며 ethanol 併用投與群은 증가를 보였다. 特히 doxycycline 4 mg/kg 단독投與群은 9,150±1,102로 유의한 감소를 보였고 doxycycline 16 mg/kg 단독投與群은 6,300±550으로 현저한 감소를 보인 반면 doxycycline 4 mg/kg, 16 mg/kg에 ethanol 병용投與群은 10,766±987, 13,262±4947으로 유의한 증가를 나타냈고, doxycycline 8 mg/kg에 ethanol 併用投與群은 13,983±736으로 현저한 증가를 보였다.

Table 9. Effects of doxycycline and ethanol on peripheral WBC in mice.

Group	WBC (mm ³)
Normal	10,080± 250
Doxy. 4 mg/kg	9,150±1,102*
Doxy. 8 mg/kg	9,470± 893
Doxy. 16 mg/kg	6,300± 550**
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	10,766± 987*
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	13,983± 736**
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	13,262±4,947*

Each value is the mean±S.D.(8~10 mice)

Significant difference from normal group.

(*p<0.05, **p<0.01)

2) 大食細胞의 活性

Doxycycline 및 ethanol 併用投與 後 carbon clearance test로 실시한 大食細胞의 活性은 Table 10과 같다. 正常群이 3.81±0.59인데 比하여 doxycycline 단독投與群 및 ethanol 병용投與群에서 약간 증가하였으나 유의성을 없었다.

5. 生化學的 檢査所見

各 實驗群은 2週間 飼育한 後 測定한 生化學的 檢査 結果는 Table 11과 같다. 總血清蛋白濃度는 正常群이 7.68±0.36 g/dl인데 比하여 全 群이 減少를

Table 10. Effects of doxycycline and ethanol on phagocyte activity in mice.

Group	Phagocyte activity
Normal	3.81±0.59
Doxy. 4 mg/kg	3.87±1.04
Doxy. 8 mg/kg	3.81±1.02
Doxy. 16 mg/kg	4.31±1.17
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	4.54±1.34
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	4.68±1.31
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	4.67±1.21

Phagocyte activity index is a constant from a formula relating the cube root of K to the ratio of body weight to the weight of the liver and spleen.

Each value is the mean±S.D. (8~10 mice)

보였다. 특히 ethanol併用投與群은 현저한 減少가 있었다. Albumin의 경우 正常群이 3.91±0.17 g/dl인데 比하여 doxycycline 8 mg/kg 단독 投與群은 4.53±0.40 g/dl으로 현저한 增加를 보인 반면 ethanol併用投與群은 全群이 有意한 減少를 보였다.

Globulin의 경우 正常群이 3.78±0.20 g/dl인데 比하여 全群이 減少를 보였고 특히 ethanol併用投與群은 2.59±0.95 g/dl, 현저한 減少를 보였다.

한편 albumin과 globulin의 比는 正常群이 1.03±0.40인데 比하여 全群이 증가를 보였고 특히 doxycycline 4 mg/kg, 8 mg/kg 投與群에 ethanol

Table 11. Effects of doxycycline and ethanol on the serum in mice.

Group	Protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Globulin (g/dl)	A/G ratio
Normal	7.68±0.36	3.91±0.17	3.78±0.20	1.03±0.40
Doxy. 4 mg/kg	7.18±0.67	3.87±0.25	3.31±0.42	1.17±0.59
Doxy. 8 mg/kg	7.88±1.55	4.53±0.40**	3.35±1.34	1.68±0.90
Doxy. 16 mg/kg	7.00±2.21	3.78±0.44	3.22±1.90	1.77±1.10
Doxy. 4 mg/kg+EtOH	6.13±1.05**	3.50±0.10**	2.59±0.95**	1.52±0.41*
Doxy. 8 mg/kg+EtOH	6.13±1.05**	3.46±0.47*	2.62±1.25**	1.70±0.86*
Doxy. 16 mg/kg+EtOH	5.78±0.35**	3.27±0.21**	2.51±0.14**	1.30±1.50

Each value is the mean±S.D. of 8~10 mice.

Significant difference from normal group (*p<0.05, **p<0.01)

併用投與群은 1.52±0.41, 1.70±0.86으로 有意한 증가를 보였다.

考 察

脾臟은 淋巴球 및 網內系 細胞로 構成되어 있는 末梢免疫臟器로 免疫反應에 重要な 역할을 하고 있다²⁰⁾. 본 실험에서 脾臟 重量의 減少로 미루어 doxycycline 및 ethanol의 併用投與가 末梢免疫臟器에 약간의 영향이 있을 것으로 보인다. 또한 胸腺은 中樞淋巴組織으로 T-淋巴球의 分化에 깊이 關여하고 있는 바 本 實驗에서 ethanol併用投與가 doxycycline 단독投與보다 더욱 흉선의 重量이 減少되어 Tennenbaum 등의 報告⁷⁾와 一致하였다. 이러한 胸腺의 萎縮은 T-cell 依存性 免疫에 影響이 있

을 것으로 思料된다.

體液性 免疫反應 가운데 T-淋巴球 의존성 抗原이 緬羊赤血球에 對한 血清抗體인 赤血球 凝集素價 및 溶血素價의 測定은 血中 體液性 免疫抗體의 消長을 測定하는데 널리 利用되고 있다²¹⁾. 本 實驗에서 赤血球 凝集素價는 doxycycline 및 ethanol併用投與에 의해서 減少하였으며 溶血素價는 doxycycline 單獨投與 및 ethanol併用投與群에서 현저하게 減少하였다. 이는 Chakrabarty 등의 報告로 미루어²²⁾ 赤血球 溶血素價의 현저한 감소는 補體의 활성화의 低下와 깊은 關聯성이 있는 것으로 사료된다.

Arthus反應은 多形核白血球가 抗原, 抗體복합체 및 抗原-抗體복합체의 補體 등의 거대분자들의 吞噬으로 유리되는 lysosomal enzyme에 의하여 일어난는 항체 매개형 過敏反應 일종으로 本 實驗에서

正常群에 비해 實驗群 全群이 Arthus反應이 減少되었으며 赤血球 溶血素價의 減少와 더불어 doxycycline 및 ethanol 併用投與群에 있어서 doxycycline 用量的 增加가 體液성 免疫을 더욱 減少시킨 것으로 사료된다.

遲延性 過敏反應은 感作 T-림巴球에 의해 유리된 lymphokine 등의 화학 전달물질에 의한 細胞性 免疫反應으로 특히 大食細胞가 깊이 관여하는 바²¹⁾ 本實驗에서 正常群에 비해 實驗群 全群이 減少하였으며 특히 doxycycline 및 ethanol 併用投與群에서 더욱 低下하여 rat에 慢性的으로 ethanol을 投與하면 遲延形 過敏反應이 低下한다는 Tennenbaum 등의 報告와 一致한 점으로⁷⁾ 미루어 doxycycline의 細胞性 免疫抑制作用과 ethanol의 抑制作用이 相乘的으로 作用하였다고 思料된다.

脾臟細胞의 Rosette 形成은 주로 T-cell에 의해서 이루어지는 바²³⁾ 本實驗에서 正常群에 비해 全群이 Rosette 形成細胞數가 현저히 減少하였는데 이는 Wybrane 등의 報告로 미루어²⁴⁾ doxycycline 단독투여와 ethanol 併用投與로 effector T-cell의 기능을 선택적으로 抑制하였을 가능성과 doxycycline 단독투여와 ethanol 併用投與로 S-RBC와 結合할 수 있는 림巴球에 doxycycline 단독투여와 ethanol 併用投與가 직접 또는 간접적으로 作用하여 T_H細胞와 T_S細胞의 作用에 影響을 비친 結果라고 思料되며 doxycycline 단독投與보다 ethanol 併用投與가 더 큰 것으로 보인다.

末稍循環 白血球는 正常群에 비해 doxycycline 단독投與群에서는 減少하였으나 ethanol 併用投與群에서는 顯著히 증가하여 ethanol의 投與에 의한 장애에 기인한 것으로 보인다.

大食細胞의 活性은 抗原에 依한 免疫能의 發顯 및 Interleukine의 분비에 重要な 投害을 하며 그 탐식능을 網狀組織內皮系에 影響을 끼쳤는가를 測定한 지표로 利用되고 있다. 本實驗에서는 正常群에 비해 ethanol 併用投與群이 doxycycline 단독投與群보다 有意性 없게 增加하여 doxycycline이 大食細胞에 有意한 效果가 없다는 William 등의 報告와 거의 一致한 것으로 미루어²⁵⁾ ethanol에 의한 肝機

能장애와 밀접한 연관성이 있을 것으로 思料된다.

生化學的 檢査所見에서 總血清蛋白의 量과 albumin의 量은 正常群에 比하여 doxycycline 8 mg/kg 단독投與群만이 增加를 보인 反面 全群에서 ethanol 併用投與群이 doxycycline 단독投與群보다 현저히 減少한 점으로 미루어 네프로제症候群 및 肝障害에 기인한 것으로 思料된다.

따라서 doxycycline에 ethanol 併用投與群은 doxycycline 단독投與群보다 免疫毒性을 더욱 增加시키는 경향을 보였다. 그러므로 앞으로 이 점에 對한 研究가 더욱 必要하다고 思料된다.

結 論

Doxycycline과 ethanol이 mouse의 免疫反應에 미치는 影響은 다음과 같다.

1. Doxycycline 단독투여와 ethanol 併用投與는 正常群에 比해 脾臟과 胸腺의 體重比를 減少시켰다.
2. Ethanol 併用投與는 doxycycline 단독投與한 것보다 體液性 및 細胞性 免疫反應을 더욱 減少시켰다.
3. 末稍循環 白血球는 正常群에 比해 doxycycline 단독投與에서는 減少하였으나 ethanol 併用投與는 有意性있게 증가하였다.
4. Ethanol 併用投與는 혈청의 A/G 比를 低下시켰다.

REFERENCES

1. Galamros, J.T.: Alcohol and liver disease; *Am. J. Digest. Dis.*, **14**, No. 7, 477 (1969)
2. Rubin, E. *et al.*: Ethanol increases hepatic smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes. *Science*, **159**, 1469 (1968)
3. Slater, T.F., *et al.*: Changes in liver nucleotide concentrations in experimental liver injury, 2 cute ethanol poisoning. *Biochem. J.*, **93**, 267 (1964)

4. Mcfarland W., Libre E.P.: Abnormal leukocyte response in alcoholism. *Ann Intern Med.* **57**, 865 (1963)
5. Magdalena R., Bereny, M.D., Bernard Straus, M.D., Luis Avila, M.D.: Rosettes in alcoholic cirrhosis of the liver. *JAMA*, **232**, 44 (1975)
6. Loose, M.I., Stege, T. and Diluzio, N.R.: The influence of acute and chronic ethanol or bourbon administration on phagocytic and immune responses in rats. *Exp. Mol. Pathol.*, **23**, 459 (1975)
7. Tennenbaum, J.I., Ruppert, R.D., St. pierrd R.L. and Green berger, N.J.: The effect of chronic alcohol administration on the immune responsiveness of rats. *J. Allergy*, **44**, 272 (1969)
8. Tapper, M.L.: Infections complicating the alcoholic host. In Grieca, M.H.: Infections in the abnormal host. Yor KeMical Books, New York, 474 (1980)
9. Göran banck & Arne forsgren: Antibiotics and suppression of lymphocyte fuction in vitro. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, **16**, 554, (1979)
10. Gnarpe, H. & Lesile, D.: Tetracyclines, and host defense mechanisms. Doxycycline interference with phagocytosis of E. coli. *Microbios*, **10A**, 127 (1974)
11. Martin, R.R., warr. G.A., Couch, R.B., Yeager H. & Knight, V.: Effects of tetracyclines on chemotaxis. *J. Infect. Dis.*, **129**, 110 (1974)
12. Forsgren, A. & Schemeling, D.: Effect of antibiotics on chemotaxis of human leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother.*, **11**, 580 (1977)
13. Reed, H.D., Crowle, P.K. and Ha, T.: Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships In immuno-deficient animals, B. Ssordet ed. Karger Baselip 184 (1984)
14. Garvey, J.S., Cremer, N.E., Sussclorf, D.H.: Methods in immunology, 3rd, 449 (1980)
15. Sugimoto, Kojima, A.M., Ya ginuma, K. and Gashira, Y.E.: Cell mediated and humoral immunity in mice. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **28**, 23 (1975)
16. Elliott, B.E., J.S. Haskill.: Characteristics of thymus-derived bonemarrow-derived Rosette forming lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**, 68 (1973)
17. Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C., and Halpern, B.N.: Etude quantitative du l' activite granulopexique du systeme reticulo endothelial Chez La Souris., C.R., *Soc. Biol. Paris.*, **148**, 431 (1954)
18. 水野映二等, 臨床病理, *Biuret Method.*, **19**, 427 (1971)
19. Doumas, *et al.*: *Clin. Chim. Acta.*, **31**, 87 (1971)
20. Simonsen, M.: Graft versus host reaction. Their natural history and applicability as tools of reserch. *Progr. Allergy*, **6**, 349 (1961)
21. Kim, J.H.: Immunobiological studies in mice treated with chemical carcinogen 3-methyl cholanthrene, Dept. of Vet. Med. Jeonbuk. Natn 1. Univ. Graduate School (1983)
22. Chakrabarty, A.K., *et al.*: Effects of antibacterial agents on the complement system. *Immunopharmacology*, **3**, 281 (1981)
23. Back, J.F., and Dardenne, M., Autigen recognition by T lymphocytes. *Cell Immunol.*, **3**, 1 (1972)
24. Wybran, J., Garr, M.C., and Fudenberg, H.H.: The Human-Rosette forming cell as a marker of population of thymus derived Cells. *J. Clin. Invert.*, **51**, 2537 (1972)
25. William D. welch, Dave davis, & Lauri D. Thrupp: Effect of antimicrobiol agents on human polymorphonuclear leukocyte microbicidal function. *Antimicrobial agents & Chemotherapy* **20**, 15, July (1981)