

Squalene投與가 마우스의 感染 防禦機能에 미치는 影響

박해영 · 안년형†
원광대학교 약학대학
(1992년 5월 2일 접수)

The Effect of Squalene Administration on the Protective Fuction Against Infection in Mice.

Hae Young Park and Nyeon Hyoung An†
College of pharmacy, Won Kwang University, Iri, 570-749, Korea
(Received May. 2, 1992)

This study was designed to estimate the ability of squalene treated mice to eliminate systemically infected bacteria and fungi and to elucidate the mechanism.

As a result of measuring the ability to remove systemically infected bacteria and fungi, The ability of mice to remove the organism was found to increase in squalene treated mice when compared with control mice. And also the ability of phagocytic cells to produce Reactive Oxygen Intermediate(R.O.I.) increased in squalene treated mice. When the NADPH oxidase activity that make R.O.I. produce was measured, the activity increased in squalene treated mice, too.

Therefore the good clearance of live organism in squalene treated mice is likely to relate to phagocytic cell activation. The activation of phagocytic cells might be mediated via the increased production of R.O.I. due to the increase of NADPH oxidase activity.

緒 論

Squalene은 acetyl coA로부터 合成되고 cholesterol生合成 中間體로 作用한다^{1, 2)}. squalene의 人體 血漿中의 濃度는 약 1.9~3.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 程度이나 Influenza 患者에 있어서는 血中 濃度가 190 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 까지 上昇한다^{3, 4)}.

血中의 squalene이 cholesterol로 變하는 것 이외의 生體내 舉動에 관한 研究는 많지 않다.

最近 食生活 樣式의 變化로 動脈硬化 및 高脂血症을 일으키는 血中 cholesterol值가 問題視되면서

cholesterol合成에 關與하는 squalene epoxidase의 저해제에 關한 研究가 활발히 進行되고 있다^{7, 10)}. 또한 外因性 squalene에 依한 體內 脂質代謝 變化에 關하여 Ichikawa 등¹²⁾은 squalene을 rat에 경구 投與한 結果 體重減少, HDL-cholesterol치 減少, TBA치가 增加하므로 squalene의 投與는 오히려 高脂血症을 惡化시킨다고 보고했다.

한편, squalene의 最近 研究動向은 癌 및 免疫에 미치는 影響에 關해 초점이 맞추어 지고 있다. squalene의 抗癌效果에 關하여 Ikekawa 등¹⁸⁾은 squalene이 in vivo 및 in vitro 상에서 細胞毒性은

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

없으나 마우스에 있어서 sarcoma 180의 성장을 억제한다고 보고하였고, Yamawaki등¹⁹⁾은 Norcardia rubra Cell Wall Skeleton(N-CWS)에 대한 용媒로서 Drakeol 6VR 대신 squalene이나 squalane을 사용하면 allogeneic mice의脾臟細胞에서細胞媒介性細胞毒성을 더욱 효과적으로誘導한다고 보고하였고, Hirai등²⁰⁾은 squalene 만으로는 항암효과가 없으나 squalene 존재하에서 N-CWS를 投與하면 squalene이 없을 때 보다 항암 효과가上昇한다고 보고하였다. 또한 Nakawa등²¹⁾은 squalene이 V79 cell line에 대한 항암제의細胞毒성을上昇시킨다고 보고하였다.

Squalene의 免疫에 關한 報告로서, Kohashi등²²⁾은 squalene-type adjuvant가 rat에 있어서 精製 tuberculin에 대한 遲延形 過敏反應을 誘導하는 데 有效하다고 報告하였고, Ohkuma등²³⁾은 sarcoma 180을 投與한 ICR mouse에 있어서 squalene을 投與했을 때 大食細胞를 活性化시키고 IgM 生成을 上昇시킨다고 報告하였고, Kim등²⁴⁾은 squalene이 체액성 및 細胞性 免疫을 增加시킨다고 報告하였다.

以上の 結果로 미루어 보아 squalene이 외부균에 대한 個體의 방어기능에 影響이 있을 것으로 思料되며, 그 影響은 生균에 대한 主要 방어기능을 擔當하는 吞噬細胞에 依할 것이라 생각된다. 이에 본 著者는 變應능 上昇效果가 있다고 報告된 squalene이 生균을 全身感染시킨 mouse의 生균 제거능에 미치는 影響과 그 역할을 擔當하는 吞噬세포의 살균기전을 研究한 結果 知견을 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗 方法

1. 實驗動物

生後 5~6週齡, 體重 17~21g의 Balb/c male mouse를 1週間 適應시킨후, 5~10마리를 1群으로 분류하여 實驗에 사용하였다.

2. 實驗材料

Squalene : Sigma Chem.Co.(U.S.A.), Staphylococcus aureus(ATCC25923), Escherichia albicans(ATCC), Mannitol agar : Difco Lab.(U.S.A.), Macconkey agar : Difco Lab.(U.S.A.), Sabouraud dextrose agar : Difco Lab.(U.S.A.), Sodium thioglycol-

late : Sigma Chem.Co.(U.S.A.), Phorbol myristate acetate(PMA) : Sigma Chem. Co.(U.S.A.), Luminol : Sigma Chem. Co.(U.S.A.), Lucigenin : Sigma Chem. Co.(U.S.A.), NADPH : Sigma Chem. Co.(U.S.A.).

3. 實驗器機

Luminometer(LB9505, berthold) Spectrofluorometer(SFM25, Kontron instrument)

4. 供試藥物의 投與

Squalene은 sigma chemical co.(U.S.A.)로부터 구입하였으나, 순도는 98~100%로서 1ml당 약 0.86g인 것을 사용하였다. Squalene의 投與는 mouse당 0.1ml 및 0.2ml를 實驗群에 投與했고, 對照群에는 D.W를 0.2ml씩 15일간 投與했다.

5. 微生物 및 實驗動物의 汚染

1) Staphylococcus aureus : Gram 陰性菌으로는 皮膚의 正常細菌叢을 이루는 菌의 하나인 S.aureus (標本菌株 ATCC 25923)를 使用하였으며, brain heart infusion broth에 37℃에서 2時間 培養한 生菌 1×10⁷ Colony forming unit(이하 "CFU"로 表示)를 全身汚染을 爲해서 腹腔內 注射하였다.

2) Escherichia coli : Gram陰性菌으로는 臟內 正常細菌叢을 이루는 菌의 하나인 E.coli(標準菌株 ATCC 25922)를 使用하였으며, brain heart infusion broth에 37℃에서 2時間 培養한 生菌 1×10⁷ CFU를 全身感染을 爲해서 腹腔內 注射하였다.

3) Candida albicans : 眞菌으로는 自然界에 널리 分布하는 常在眞菌의 하나인 C.albicans를 使用하였으며, Sabouraud dextrose broth에 37℃에서 24時間 培養한 生眞菌 1×10⁷ CFU를 全身感染을 爲해서 腹腔內 注射하였다.

6. 微生物의 定量

實驗動物에 微生物을 感染시킨 24時間 後에 犧牲시키고 肝臟, 脾臟 및 腎臟 등에서 生劔하여 무게를 단 다음, 그 일정량을 취하여 phosphate buffered saline(PBS)에 homogenation시켰다. 均質化된 試料를 PBS로 10배 希釋한 다음, 그중의 0.2ml를 취하여 S. aureus, E.coli, C.albicans를 각각 定量하기 위하여 Mannitol salt agar, MacConkey agar, 그리고 Sabouraud dextrose agar에 pour plate technique으로

Squalene 투여가 마우스의 감염 방어기능에 미치는 영향

각각의 微生物을 37℃에서 48시간 培養한 다음, 각 기관 1 gram에 대한 CFU를 구하였다.

7. Veronal buffer saline(이하 VBS)의 調製

8.3g NaCl, 0.029 sodium barbital, 102mg MgCl₂, 22mg CaCl₂, 200 mg glucos, 1N-HCl 3.5ml를 150 ml의 증류수에 녹이고 total volume을 200ml로 맞추었다. 이 溶液 40ml를 취해 180ml의 2차 증류수를 가하고 1N-HCl로 pH를 7.3으로 맞춘 다음 total volume을 200ml로 맞추어 實驗에 사용하였다.

8. 食食細胞의 反應 酸素 中間物質(ROI: Reactive Oxygen Intermediate)의 生成能 測定

1) 多形核 白血球 細胞의 誘導

藥物이 投與된 마우스 腹腔에 滅菌된 4.5% Brewer's modified thioglycolate medium 3ml을 注射하고 24時間 후에 PBS(pH 7.4)로 腹腔을 세척하여 多形核 白血球가 풍부한 peritoneal exudate cell (PECH)을 얻었다. PEC는 차가운 PBS로 400×g에서 10분간 원심분리하여 2회 세척한 후 VBS에 1.5×10⁶ cells/300μl가 되도록 적정된 후 chemiluminescence(CL)를 測定하였다.

2) 大食細胞(Macrophage)의 誘導

藥物이 投與된 마우스의 腹腔에 滅菌에 4.5% Brewer's modified thioglycolate medium 3ml을 注射하고 3일 후에 PBS(pH 7.4)로 腹腔을 세척하여 大食細胞가 豊富한 PEC를 얻었다. PEC는 PBS로 2회 세척후 VBS에 1.5×10⁶ cells/300μl가 되도록 적정하여 CL을 측정하였다.

3) Lucigenin에 의해 誘導된 CL의 測定

Veronal Buffered Saline을 이용해 1.5×10⁶ cells/300μl로 적정된 PEC 단세포 浮遊液을 Luminometer(LB 9505, berthold)내에서 37℃로 15~30분동안 preincubation 시킨후 O₂를 測定할 수 있는 Chemiluminogenic probe인 10mM의 Lucigenin 10μl를 주입하고 安精化 시킨후 多形核 白血球나 大食細胞를 자극시킬 수 있는 5.3μM phorbol myristate acetate(PMA) 10μl를 주입하고 37℃條件에서 약 60분간 CL를 測定했다.

4) Luminol에 의해 誘導된 CL의 測定

Veronal Buffer Saline을 이용해 1×10⁶ cells/300 μl로 적정된 PEC 단세포 浮遊液을 Luminometer (LB 9505, berthold)내에서 37℃로 15~30분간 preincubation 시킨후 H₂O₂를 測定할 수 있는 chemiluminogenic probe인 10mM의 Luminol 10μl를 注入하고 安精化시킨 후 多形核 白血球나 大食細胞를 자극시킬 수 있는 5.3μl PMA를 注入하고 37℃條件에서 약 60분간 CL을 測定했다.

實 驗 結 果

1. Squalene 投與가 生菌으로 全身感染된 實驗 動物 各 臟器에서의 菌 檢出量에 미치는 影響

全身에의 微生物 感染에 미치는 squalene의 影響을 알아 보기 위하여 mouse에 15일간 squalene을 投與한 후 生菌으로 感染시키고 그 24時間후에 各 臟器에서의 菌檢出量을 實驗한 結果는 Table I~III, Fig.1~9와 같다.

Table I. The effect of squalene oral administration on the ability of Balb/c mice to eliminate systemically infected E.coli(1×10⁸ CFU) at various squalene doses.

Dose (ml/mouse)	Mean no. of E.coli recovered/g of organ		
	liver	spleen	kidney
Con. (D.W. 0.2ml)	* 5440 ± 400.26	1850 ± 289.35	1950 ± 96.15
0.1ml	4790 ± 223.15	750 ± 78.71	808 ± 89.80
0.2ml	4080 ± 402.49	592 ± 43.56	756 ± 128.80

*Mean ± S.E

*These data were calculated by the mean of five cases

Table 1 과 Fig.1-3은 mouse당 E.coli 1×10^7 CFU를 腹腔내 注射하고 그 24時間 후에 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量을 實驗한 結果이다. 對照群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 各各 5,440 \pm 400.26, 1850 \pm 289.35, 1950 \pm 96.15인 반면 0.1 ml squalene 投與群의 肝臟, 脾臟, 腎臟에서의 菌檢

出量이 各各 743 \pm 13.28, 750 \pm 78.71, 808 \pm 89.80으로, 脾臟, 腎臟에서 對照群에 比하여 有意性 있는 減少를 보였고, 0.2ml squalene投與群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 各各 630 \pm 15.83, 238 \pm 15.84, 202 \pm 5.23으로 肝臟에서 對照群에 比해 有意性 있는 減少를 보였다.

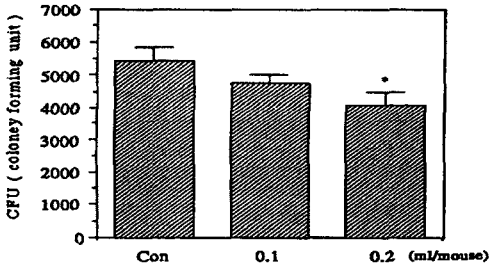


Fig. 1. The change of E. coli colony forming unit (CFU) in the mouse liver when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data show Mean \pm SE. *p<0.05

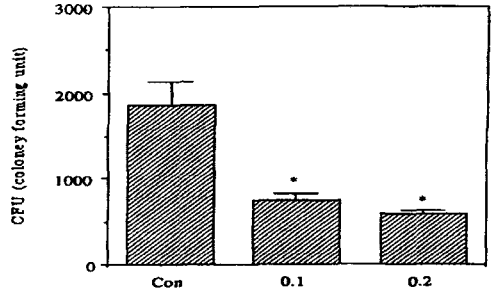


Fig. 2. The change of E. coli CFU in the mouse spleen when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data show Mean \pm SE. *p<0.05

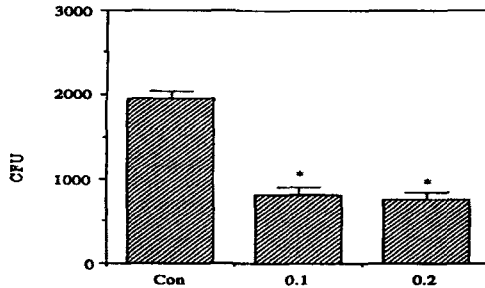


Fig. 3. The change of E. coli CFU in the mouse kidney when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data show Mean \pm SE. *p<0.05

Squalene투여가 마우스의 감염 방어기능에 미치는 영향

Table II 과 Fig.4-6는 mouse당 *S. aureus* 1×10^7 CFU를 腹腔 内 注射하고 그 24時間 후에 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量을 實驗한 結果이다. 對照群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 各各 864 ± 37.79 , 294 ± 37.80 , 318 ± 44.14 인 반면 0.1 ml squalene 投與群의 肝臟, 腎臟 및 腎臟에서의

菌檢出量이 各各 820 ± 67.07 , 260 ± 65.29 , 244 ± 30.00 으로 肝臟, 腎臟에서, 對照群에 비하여 減少하였으나 有意性은 없었고, 0.2ml squalene投與群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 630 ± 15.83 , 238 ± 15.84 , 252 ± 5.23 으로 肝臟에서 對照群에 비해 有意性 있는 減少를 보였다.

Table II. The effect of squalene oral administration on the ability of Balb/c mice to eliminate systemically infected *S.aureus* (1×10^7 CFU) at various squalene doses in organs.

Dose (ml/mouse)	Mean no. of <i>S.aureus</i> recovered/g of organ		
	liver	spleen	kidney
Con. (D.W. 0.2ml)	864 ± 37.79	294 ± 37.80	318 ± 44.14
0.1ml	820 ± 67.07	260 ± 65.29	244 ± 30.00
0.2ml	630 ± 15.83	238 ± 15.84	202 ± 5.23

*Mean \pm S.E

*These data were calculated by the mean of five cases

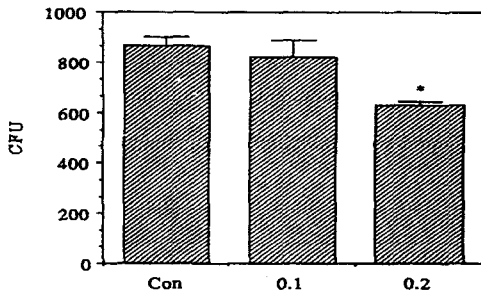


Fig. 4. The change of *S.aureus* CFU in the mouse liver when squalene was administered. (control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean \pm SE. *p<0.05

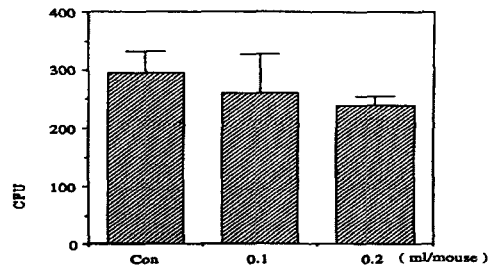


Fig. 5. The change of *S.aureus* CFU in the mouse spleen when squalene was administered. (control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean \pm SE.

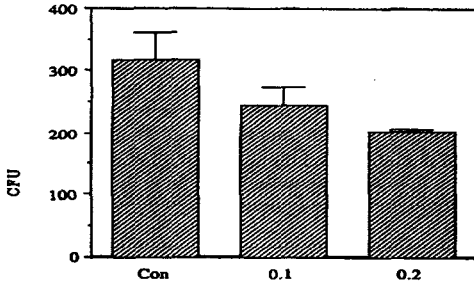


Fig. 6. The change of S.aureus CFU in the mouse kidney when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean±SE.

Table III과 Fig.7-9는 mouse당 C.albicans 1×10^7 CFU를腹腔内注射하고 그 24시간 후에 肝臟, 脾臟, 및 腎臟에서의 菌檢出量을 實驗한 結果이다. 對照群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 各々 810 ± 26.56 , 284 ± 15.97 , 362 ± 30.37 인 반면 0.1 ml squalene 投與群의 肝臟, 脾臟, 腎臟에서의 菌檢出量이 各々 742 ± 13.28 , 150 ± 15.97 , 292 ± 30.37 으로 肝臟, 脾臟, 腎臟에서 對照群에 比하여 유의 性인 減少를 보였고, 0.2ml squalene 投與群의 肝臟, 脾臟 및 腎臟에서의 菌檢出量이 604 ± 42.93 , 278 ± 9.57 , 315 ± 14.31 로 肝臟에서 對照群에 比해 有意性 있는 減少를 보였으나, 脾臟 및 腎臟에서의 0.1 squalene 投與群보다 增加하였다.

Table III. The effect to squalene oral administration on the ability of Balb/c mice to eliminate systemically infected Calbicans (1×10^7 CFU) at various squalene doses in organs.

Dose (ml/mouse)	Mean no. of C.albicans recovered/g of organ		
	liver	spleen	kidney
Con.	810 ± 26.56	284 ± 15.97	362 ± 30.37
0.1ml	742 ± 13.28	150 ± 15.97	292 ± 30.37
0.2ml	604 ± 42.93	278 ± 9.57	315 ± 14.31

*Mean±S.E

*These data were calculated by the mean of five cases

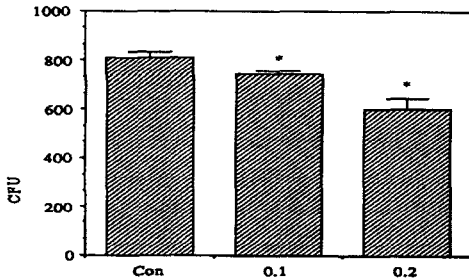


Fig. 7. The change of C.albicans CFU in the mouse liver when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean±SE. *p<0.05

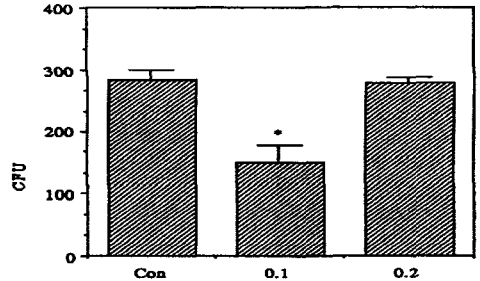


Fig. 8. The change of C.albicans CFU in the mouse spleen when squalene was administered.(control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean±SE. *p<0.01

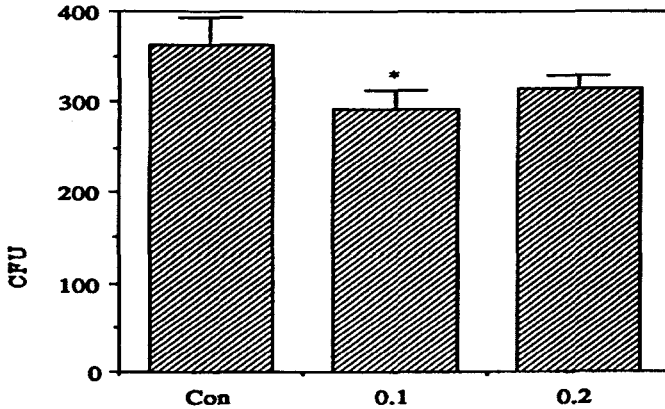


Fig. 9. The change of *C. albicans* CFU in the mouse kidney when squalene was administered. (control, 0.1ml squalene/mouse, 0.2ml squalene/mouse) Data shows Mean ± SE. *P<0.05

2. squalene 투여가 mouse의 탐식세포의 R.O.I. 생성능에 미치는 영향

앞에서 보는 바와 같이 squalene 투여가 生菌으로 全身感染시킨 mouse의 각 臟器중의 生菌 檢出量을 減少시켰다는 사실은 非特異的 防禦機能을 擔當하

는 好中球 및 大食細胞의 活性에 근거하리라는 근거를 바탕으로 食食細胞의 殺菌機能에 관여되는 O_2^- 및 H_2O_2 生成能을 測定한 結果는 Table IV, Fig. 11-13 과 같다.

Table IV. The effect of squalene administration on R.O.I. production.

Chemiluminogenic probe and cell	Dose	integral value
luminol-amplified chemiluminescence in murine peritoneal neutrophil	control	3.16×10^7
	0.1	6.12×10^7
	0.2	6.25×10^7
lucigenin-amplified chemiluminescence in murine peritoneal neutrophil	control	1.38×10^7
	0.1	1.49×10^7
	0.2	1.41×10^7
luminol-amplified chemiluminescence in murine peritoneal macrophage	control	1.54×10^7
	0.1	1.61×10^7
	0.2	2.43×10^7
lucigenin-amplified chemiluminescence in murine peritoneal macrophage	control	5.35×10^7
	0.1	6.48×10^7
	0.2	7.04×10^7

Fig.10은 thioglycolate로 誘導된 好中球를 PMA로 자극함으로써 生成한 H_2O_2 를 Luminol과 反應시켜 여기된 反應中間體가 基底狀態로 되면서 放出的 電子를 CPM單位로 60분간 測定한 curve의 全體 積分面積이다. Intergal value가 對照群은 3.16×10^7 인 반면, 0.1ml squalene投與群은 6.12×10^7 , 0.2ml squalene 投與群은 6.25×10^7 로 對照群에 비해 增加하는 傾向을 보였다.

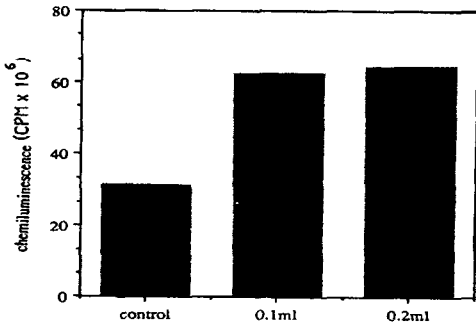


Fig. 10. The effect of squalene administration(0.1ml, 0.2ml/mouse) on the R.O.I. production. Animals were given orally for 15 days. This represents effect of squalene administration on luminol-amplified chemiluminescence of murine peritoneal neutrophil.(thioglycolate induction : 1 days). Significant increment was shown in mice treated with 0.1ml and 0.2ml/mouse.

Fig.11은 thioglycolate로 誘導된 好中球를 PMA로 자극함으로써 生成한 O_2 를 lucigenin과 反應시켜 여기된 反應中間體가 基底狀態로 되면서 放出的

電子를 CPM單位로 60분간 測定한 curve의 全體 積分面積이다. Intergal value가 對照群은 1.38×10^7 인 반면, 0.1ml squalene 投與群은 1.49×10^7 , 0.2ml squalene 投與群은 1.41×10^7 로 對照群에 비해 別 차이 없었다.

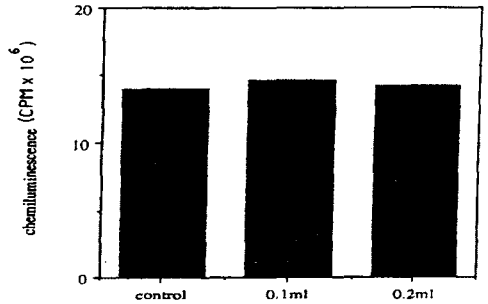


Fig. 11. The effect of squalene administration(0.1ml, 0.2ml/mouse) on the R.O.I. production. Animals were given orally for 15 days. This represents effect is squalene administration on lucigenin-amplified chemiluminescence of murine peritoneal neutrophil.(thioglycolate induction : 1 days).

Fig. 12은 thioglycolate로 誘導된 대식세포를 PMA로 자극함으로써 生成한 H_2O_2 를 Luminol과 反應시켜 여기된 反應中間體가 基底狀態로 되면서 放出的 電子를 CPM單位로 60분간 測定한 curve의 全體 積分面積이다. Intergal value가 對照群은 1.54×10^7 , 0.2ml squalene 投與群은 2.43×10^7 로 對照群에 비해 增加하는 傾向을 보였다.

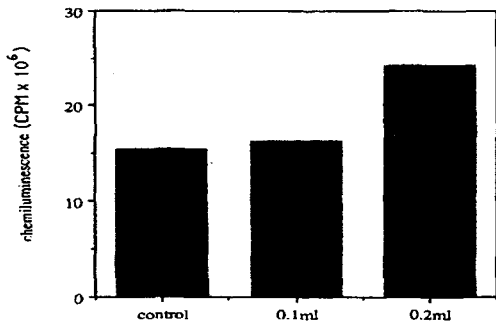


Fig. 12. The effect of squalene administration(0.1ml, 0.2ml/mouse) on the R.O.I. production. Animals were given orally for 15 days. This represents effect of squalene administration on lumimol-amplified chemiluminescence of murine peritoneal macrophage.(thioglycolate induction : 3 days). Significant increment was shown in mice treated with 0.2ml/mouse.

Fig.13은 thioglycolate로誘導된 대식세포를 PMA로 자극함으로써生成한 O₂를 lucigenin과反應시켜 여기된反應中間體가 基底狀態로 되면서放出한 電子를 CPM單位로 60분간 測定한 curve의全體積分面積이다. Intergal value가 對照群은 5.35 × 10⁷인 반면, 0.1ml squalene 投與群은 6.48 × 10⁷, 0.2ml squalene 投與群은 7.40 × 10⁷로 對照群에 비해增加하는 傾向을 보였다.

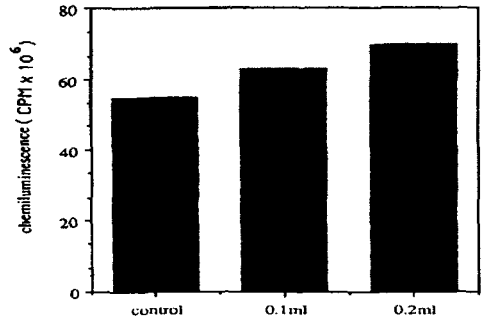


Fig. 13. The effect of squalene administration(0.1ml, 0.2ml/mouse) on the R.O.I. production. Animals were given orally for 15 days. This represents effect of squalene administration on lucigenin-amplified chemiluminescence of murine peritoneal macrophage.(thioglycolate induction : 3 days). Significant increment was shown in mice treated with 0.1ml, 0.2ml/mouse.

3. squalene의 投與가 好中球중의 NADPH oxidase에 미치는 影響

好中球가 squalene의 投與에 의해 O₂生成能이增加한것은 NADPH oxidase活性에 直間接적으로 影響을 미쳤기 때문이라는 着想하에서 NADPH oxidase의 活性을 測定하였다. NADPH oxidase活性測定은 NADP로부터 NADPH oxidase에 의해生成된 NADP의 濃度를 測定하여 間接적으로 活性度를 比較하였다.

Fig.14는 과량의 NADPH 존재하에서 강알카리 처리에 의한 NADPH의 螢光度가 어떠한 影響을 받는지의 眞否를 밝히기 위해 實驗한 結果이다. NADPH 존재하에서 NADP螢光度가 약간 떨어져진 하였으나 큰 차이는 보이지 않았다. 그래서 NADP만을 이용하여 螢光測定한 것을 STANDARD CURVE로 이용하였다.

Fig.15에서 보는바와 같이 Squalene 投與群에서 NADPH oxidase에 의해 NADP가 많이 생기는 것

으로 보아 對照群에 비해 NADPH oxidase의 活性이 증가함으로 알 수 있었다.

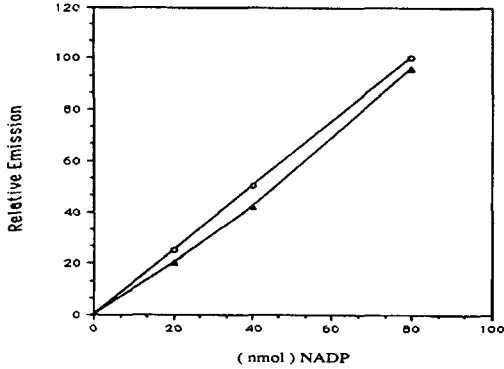


Fig. 14. Effect of excess NADPH on standard curves. The circles represent standards without excess NADPH, the triangles represent standards standards with 200 nmol NADPH. The horizontal axis denotes concentrations in terms of nmol NADP added to the 1ml incubation volume. The vertical axis is in arbitrary units : meter readings of the fuotometer expressed as percentage of the highest meter reading. Values represent means of triplicate determinations.

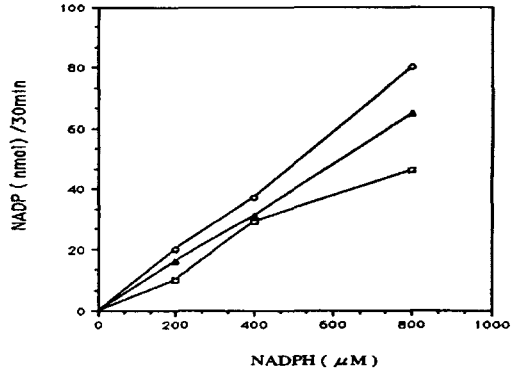


Fig. 15. NADPH oxidase activity of 27000 g granule fraction in mouse PMN(polymorphnuclear leukocytes) sonicate. The squares represent fraction isolated from control group PMN, triangles traction from 0.1 ml squalene treated group, circles traction fro, 0.2 ml squalene treated group. 100μg protein was used in assaying 2700x g granule fraction. Values represent means of triplicate determinations.

考 察

Squalene은 深해상어 간에 多量含有되어져 그 추출물이 健康食品으로 市販되고 있어 주목을 받고 있다. 이는 squalene이 高血壓, 糖尿病, 위궤양등에 효과가 있다고 믿기 때문이나 科學的 證據는 없다. 다만 緒論에서 진술한 바와 같이 squalene의 암 및 免疫에 대한 研究와 squalene의 생합성에 關聯된 研究가 활발히 進행중 에 있다.

Squalene이 mouse의 생균 저지율에 미치는 影響과 mouse의 대식세포 및 호중구의 R.O.I. 생성능 및 NADPH oxidase 활성능을 測定한 結果는 Table I ~ III, Fig.1~9에서 보는 바와 같이 squalene投與群의 각 臟器(肝臟, 脾臟, 腎臟) 前身感染시킨 생균 E. coli, C. albicans등의 제거율이 C. albicans 感染시킨 mouse의 spleen, kidney만 除外하고 대체적으로 減少하는 傾向을 보였다. 이는 squalene이 외부균이 다른 部位로 的 波及을 막으려는 好中球

및 大食細胞의 營養을 미치지 때문인 것으로 思料된다.

好中球 및 大食細胞는 외부균을 탐식하여 다른部位로의 波及을 막을 뿐 아니라 O_2^- 및 H_2O_2 와 같은 R.O.I를 生成하여 균을 殺菌한다^{27, 40)}. squalene의 投與가 mouse의 탐식세포의 R.O.I. 생성능에 미치는 影響을 測定한 結果는 Fig.10-13과 같다.

Fig.13에서 보는 바와 같이 squalene投與群에 비해 탐식세포의 R.O.I. 생성능력이 增加하였다. Ohkuma와 Kim등이 報告한 squalene의 탐식세포 活性化에 미치는 影響은 單純한 탐식세포의 탐식능만을 調査하였다. squalene 投與群에서 R.O.I. 생성능이 增加함은 탐식세포의 탐식능 뿐만아니라 살균능력도 상승시킴을 알 수 있다. 탐식세포의 탐식능 뿐만아니라 殺菌能力이 중요한것은 慢性肉牙腫症의 예들들면 알 수 있다. 이는 탐식세포의 탐식능은 正常人경우와 같으나 HMP shunt 기능저하로 살균기능이 喪失되어 있기 때문에 심각한 結果를 招來한다⁴¹⁾.

Squalene투여에 의해 탐식세포의 R.O.I. 생성능이 增加하는 것은 O_2^- 를 生成케 하는 NADPH oxidase活性에 影響이 있기 때문이라 사료되어 NADPH oxidase活性을 測定한 結果는 Fig.15와 같다. Fig.15에서 보는 바와 같이 squalene 投與群에서 NADPH oxidase의 活性이 增加하였다. NADPH oxidase活性化 經路는 2가지가 있는데, PMA와 같은 자극제에 의해 protein kinase C가 活性化되어 NADPH oxidase를 活性化시키는 經路和 막내의 receptor에 의해 phosphorylase C가 活性化 되어 protein C를 媒介로 하여 NADPH oxidase를 活性化시키는 經路가 있다. squalene의 作用經路도 위의 두가지 經路中 하나일 것으로 思料되어 더 많은 研究가 必要하다고 생각된다.

要約하면, squalene이 mouse의 生균 제거능을 上昇시키는 기전은 NADPH oxidase活性化에 依한 탐식세포의 R.O.I. 生成을 增加시켜 탐식세포의 살균능 上昇시켰기 때문인 것으로 思料된다.

結 論

Squalene이 mouse의 感染防禦機能에 미치는 影

響을 살펴 본 實驗에서 얻은 結論은 다음과 같다.

1. 生菌을 感染시킨 mouse의 각 臟器에서의 菌檢出量이 squalene 投與에서 對照群에 비해 減少하였다.
2. 好中球 및 大食細胞의 O_2^- 및 H_2O_2 生成能이 squalene投與群에서 對照群에 비해 增加되었다.
3. 好中球의 NADPH oxidase活性이 squalene投與群에서 對照群에 비해 增加하였다.

이상에서 본 바와 같이 squalene이 mouse의 生균 제거능을 上昇시키는 기전은 NADPH oxidase 活性化에 依한 탐식세포의 R.O.I. 生成을 增加시켜 탐식세포의 살균능을 上昇시켰기 때문인 것으로 思料된다.

- 1) Woodward, R. B. and Bloch, K. : The cyclization of squalene in cholesterol synthesis. *J. M. Chem. Soc.*, **75**, 2033(1953)
- 2) Wilett, J. D. sharpless, K. B., Load K. E., Van Tamelen E. E., And Clayton R. B. : Squalene-2, 3-Oxide, an Intermediate in the Enzymatic Conversion of Squalene to lanosterol and Cholesterol. *J. Bio. Chem.*, **242**, 1482-1491(1967).
- 3) Drowing, D. T., Stewart, M. E. and Strauss, J. S. : Estimation of sebum production rates in man by measurement content of skin biopsies. *J. Inv. Dermat.*, **77**, 4(1981)
- 4) Liu. G. C. K., Ahrens, E. H. J., Schreiberman, P. H., et al : Measurement of squalene in human tissue and plasma. *J. Lipid Res.*, **17**, 38 (1976).
- 5) Ichikawa, T., Tsuji, K., Hagiwara, K., Tsuda, A. and Yamanaka, Y. : Effects of oral administration of squalene on growth and lipids levels in serum and liver of rats. National Institute of Nutrition : 1-23-1, Toyama, Shinujuku, Tokyo, Japan, *Shiriea Schi*, **27**, 44(1986)
- 6) Sulpice, J. C., Erezou, J. F. : Squalene isolation by HPLC and quantitative comparison by

HPLC and GLC. *Lipids*, 19, 8(1984).

- 7) Neil S. Ryder, M. C. Dupont : Inhibition of squalene epoxidase by allylamine antimycotic compounds. *Bio. Chem. J.*, 230, 765-770 (1985).
- 8) Bonaventure M. Baya, Marc Feguer, Madelein, Francis Karst : Regulation of squalene synthetase and squalene epoxidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipid*, 24, 12(1989).
- 9) Neil S. Ryder : Inhibition of squalene epoxidase and sterol methylation by allylamine. *Bio. Chem. Soc. Trans.*, 18, 1(1990).
- 10) Luigi Cattel, Maurizio Cerui, et al : Drug design on biosynthetic study : synthesis, biological activity, and kinetics of new inhibitors of 2, 3-oxidosqualene cyclase and squalene epoxidase. *Steroids*, 53, 3-5(1989).
- 11) Sen, S. E., Wawrzenczyk, C., Prestwich, G. D. : Inhibition of vertebrate squalene epoxidase by extended and truncated analogs of trisnorsqualene alcohol. *J. Med. Chem.*, 33, 6(1990).
- 12) Sen, S. E., Prestwich, G. D. : Trisnorsqualene, a potent inhibitor of vertebrate squalene epoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4(1989).
- 13) Berg, D., Plempel, M. : Inhibitor of fungal sterol synthesis : squalene epoxidation and C-14-demethylation. *J. Enzyme inhib.*, 3, 1(1989).
- 14) Sen, S. E., Prestwich, G. D. : Trisnorsqualene cyclopropylamine : a reversible trigfatty acid composition in yeast. *Lipids*, 23, 1(1988).
- 15) Eilenberg, H., Shechter, I. : Squalene epoxidase regulation liver CHO cell. *J. Lipid Res.*, 28, 12 (1987).
- 16) Buttke, T. M., Brint S. L. : Regulation of squalene epoxidase activity by membrane fatty acid composition in yeast. *Lipids*, 23, 1(1988).
- 17) Ichikawa, T., Tsuji, K., Hagiwara, K. Tsuda, A. and Yamanaka, Y. : Effects of oral administration of squalene on growth and lipids levels in serum and liver of rats. *Shiriet*, 27, 44(1986).
- 18) Ikekawa, T., Umeki, M., Manabe, T., Yonoma, S., Irinida, K., Mizunuma, H. and Ikekawa, N. : Studies on antitumor activity of squalene and its related compounds. *Yakugaku Zasshi*, 106(7), 578(1986).
- 19) Yamawaki, M., Azuma, I., Saiki, I., Uemiyama, M., Aoki, O., Ennyu, K. and Yamamura, Y. : Antitumor activity of squalene-treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice. *Gann*, 69, 619(1978).
- 20) Hirai, O., Fujitsu, T., Satoh, H., Mori, J. and Kikuchi, H. : Influence of squalene on the antitumor action of cell wall skeleton from *Nocardia rubra*. *Oyo Yakuri Pharmacometrics*, 31(3), 649(1986).
- 21) Masayuki Nakagawa, Teruhito Yamaguchi, et al : Potentiation of the cytotoxicity of anticancer agent against cultured mammalian cell and murine tumor. *Jpn. J. Cancer Res.* 76, 315-320 (1985).
- 22) Kohashi, O., Pearson, C. M., Beck, F. J. W. and Alexander, M. : *Infect Immunol.*, 17, 244 (1977)
- 23) Ohkuma, T., Otagiri, K., Tanaka, S. and Ikekawa, J. : Intensification of host's immunity by squalene in sarcoma 180 bearing ICR mice. *J. Pharm. Dyn.*, 6, 148(1983).
- 24) Kim, J. H. : The effect of on squalene the immune response in ICR mice. 圓光大學校 學位論文(1990).
- 25) David Iverson, Lawrence R, Dechatelet, : Comparison of NADPH and NADPH oxidase activities in granules from human polymorphonuclear leukocytes with a fluometric in granules from polymorphonuclear leukocytes with a fluometric assay. *Jpn. Clinical inves.*, 159, 282-290(1977).
- 26) Kaiya, A. : Properties of shark liver oil, natural squalene and squalane. *Nisseki Rebyu*, 29, 2 (1987).
- 27) Gabler, W. L., Bullock, W. W., Creamer, H. R. : The influence of chlorhexidine on supero-

- xide generation by induced human neutrophils. *J. Peridontal Res.*, 22 : 445-450, (1987).
- 28) Ward, P. A., Cunningham, T. W., McCulloch, K. K., Johnson, K. J. : Regulatory effects of adenosine and adenine nucleotides on oxygen radical response of neutrophils. *Lab. Invest.*, 58 (4) : 438-447, (1988).
- 29) Tremoli, E., Colli, S. : Dipyrindamole inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. *Thromb. Haemost.*, 59(2) : 3422, (1988).
- 30) Worthen, G. S., Seccombe, J. F., Clay, K., Guthrie, L. A., Johnston, R. B. : The priming of neutrophils by lipopolysaccharide for production of intracellular platelet : activating factor : Potential role in mediation of enhanced superoxide secretion. *J. Immunol.*, 140 : 3553-3559, (1988).
- 31) Gryglewsky, R. J., Szccekik, A., Wandzzilak, M. : The effect of six prostaglandins, prostacyclin and Iloprost on generation of superoxideanions by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by zymosan or formyl-me-thionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem. Pharmacol.*, 36(24) : 4209-4213, (1987).
- 32) Holmes, B., Page, A. R., Good, R. A. : Studies of the metabolic activity of leucocytes from patients with genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.*, 46. 1422-1432, (1967).
- 33) Baehner, R. L., Nathan, D. G., Karnovsk, M. L. : Correction of metabolic deficiencies in the leucocytes off patients with chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.*, 49 : 865-870, (1970).
- 34) Babior, B. M., Kipnes, R. S., Curnutte, J. T. : Biological defence machanisms. The production by leucocytes of suproxide, apotential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, 52 : 741-744, (1973).
- 35) Oyanagui, Y. : Inhibition of superoxide anion production in macrophage by antiinflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.*, 25 : 1473-1480, (1976).
- 37) Klebanoff, S. J. : Antimicrobial activity of catalase at acid pH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132 : 571-574, (1969).
- 38) Paul, B. B., Straus, R. R., Jacob, A. A., Sbarra, A. J. : Function of H₂O₂, myeloperoxidase, and hexose monophosphate shunt enzymes in phagocytosing cells from different species. *Infection and Immunity* 1(4) : 338-344, (1970).
- 39) Hurst, J. K., Albrich, J. M., Green, T. R., Rosen, H., Klebanoff, S. : Myeloperoxidase dependent fluorescein chlorination by stimulated neutrophils. *J. B. C.*, 259(8) 4812-4821, (1984).
- 40) Test, S. T., Lampert, M. B., Ossanna, P. J., Thoene, J. G., Weiss, S. J. : Generation of nitrogen-choline oxidants by human phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 74 : 1341-1349.