

2007년 2월

석사학위논문

생쥐신장에서 Glycerol 유도
급성신부전에서 TNF- α , IL-6
분비에 관한 스쿠알렌의 효과

조선대학교 대학원

생물학과

기 윤

생쥐신장에서 Glycerol 유도
급성신부전에서 TNF- α , IL-6
분비에 관한 스쿠알렌의 효과

**Effects on Squalene about secretion of TNF- α & IL-6
by Glycerol-induced acute-renal
failure in mice kidney**

2007년 2월 23일

조선대학교 대학원

생물학과

기 윤

생쥐신장에서 Glycerol 유도
급성신부전에서 TNF- α , IL-6
분비에 관한 스쿠알렌의 효과

지도교수 김 종 세

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 10월

조선대학교 대학원

생물학과

기 윤

기윤의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선 대학교 교수 _____ (인)

위 원 조선 대학교 교수 _____ (인)

위 원 조선 대학교 교수 _____ (인)

2006년 11 월 (석사)

조선대학교 대학원

목 차

I . 서론	-----	1
II . 재료 및 방법	-----	4
1. 시약	-----	4
2. 실험동물	-----	4
3. 세포배양	-----	4
4. LDH 측정	-----	4
5. NO 측정	-----	5
6. Glycerol과 SQ 처리 (<i>in vitro</i> 의 경우)	-----	5
7. Glycerol과 SQ 처리 (<i>in vivo</i> 의 경우)	-----	5
8. Glycerol -유도 Cytokines의 측정	-----	5
9. 단백질 함량 측정	-----	6
10. 통계처리	-----	6
III . 결과	-----	7
1. <i>In vitro</i> 결과	-----	7

(1) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치 에 의한 LDH 결과	-----	7
(2) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치 에 의한 NO 결과	-----	8
(3) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치 에 의한 TNF- α 생성 결과	-----	9
(4) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치 에 의한 IL-6 생성 결과	-----	10

2. <i>In vivo</i> 결과	-----	11
(1) 생쥐 신장에서 glycerol 유도		
TNF- α 생성에 관한 SQ의 효과	-----	11
(2) 생쥐 신장에서 glycerol 유도		
IL-6 생성에 관한 SQ의 효과	-----	13
IV. 고찰	-----	21
V. 국문요약	-----	26
VI. 참고문헌	-----	28

LIST OF TABLES

Table 1. Analysis of cytoprotective effect of SQ or glycerol in cultured Renca cell.	-----	7
Table 2. The effects of SQ or glycerol on the NO production in cultured Renca cells.	-----	8
Table 3. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in cultured Renca cells.	-----	9
Table 4. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in cultured Renca cells.	-----	10
Table 5. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in mice kidney.	-----	12
Table 6. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in mice kidney.	-----	14

LIST OF FIGURES

Fig 1. Analysis of cytoprotective effect of SQ (0.1%) or glycerol (4mM).	-----	15
Fig 2. The effects of SQ (0.1%) or glycerol (4mM) on the NO production in cultured Renca cells (2x10 ⁵ /well)	-----	16
Fig 3. The effects of SQ (0.1 %) on the glycerol-induced TNF- α production in cultured Renca cells (2x10 ⁵ /well).	-----	17
Fig 4. The effects of SQ (0.1 %) on the glycerol-induced IL-6 production in cultured Renca cells (2x10 ⁵ /well).	-----	18
Fig 5. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in mice kidney.	-----	19
Fig 6. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in mice kidney.	-----	20

ABSTRACT

Effects on Squalene about secretion of TNF- α & IL-6 by Glycerol-induced acute-renal failure in mice kidney

Gi Yun

Adviser : Prof. Kim, Jong-Se, Ph. D

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

Kidney had recovery function toxicants, ischemia, reperfusion -induced damage, acute-renal failure (below, called ARF). ARF is characterized by a deterioration of renal function over a period of hours to days. ARF results in failure of the kidney to excrete nitrogenous waste products and maintain fluid and electrolyte homeostasis.

Nitric oxide (below, called NO) is a recently discovered mediator of cell communication involved in a variety physiological and pathophysiological processes. NO is synthesized from L-arginine by a family of enzymes called NO synthases (below, called NOS). This enzyme is present in a variety of tissues including smooth muscle cells and macrophages and take part in several immunopathological process. NO has a short half-life and is rapidly oxidized to the stable, inactive end-products, nitrite and nitrate.

Macrophages play a major role in host defense against infection and cancer. Activation of macrophages induces the production and release of many inflammatory mediators, including cytokines (TNF- α , IL-6), arachidonic acid metabolites and NO. Pro-inflammatory cytokines are produced in response to variety of stimuli including bacterial endotoxin, pro-oxidants, and certain environmental agents.

Tumor necrosis factor- α (below, called TNF- α , a 17-kDa trimeric protein)

is a proinflammatory cytokine that often is overexpressed in a number of disease states such as sepsis syndrome, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and periodontitis. TNF- α is known to be a key mediator for the induction of apoptosis in murine thymus and organization of lymphoid organs, as well as development of humoral immune response. And TNF- α can induce the production of NO. However, at high concentrations, TNF- α has disadvantageous effects, such as inducing tissue injury and potentiating septic shock.

Interleukin-6 (below, called IL-6, a 26-kDa protein) is a multifunctional cytokine. IL-6 is released by T and B lymphocytes, macrophages, fibroblasts, endothelial cells, mesengial cells, and tubular epithelial cells. And, IL-6 release is stimulated by TNF- α .

Squalene (below, called SQ), a polyunsaturated triterpene that contains six isoprene units, is a key intermediate in cholesterol biosynthesis. It received its name because of occurrence in shark liver oil (*Squalus* spp.) which is considered to be the richest source of squalene. SQ has been reported to possess antioxidant, membrane stabilizing properties, detoxic effect against diverse chemicals, protect the skin from ultraviolet radiation, protect the cyclophosphamide-induced toxicity, effect of bFGF, protect of alcohol damage.

The aim of this study is to evaluate the effects squalene on the prevention of experimental ARF induced by glycerol.

In vitro experiments, The cytotoxic effects of SQ (0.1%) was evaluated by the LDH. And, We were investigated to production of NO, TNF- α and IL-6 in Renca kidney cells (2×10^5 /well) after treatment glycerol(4mM) or SQ (0.1%).

In vivo experiments, We were investigated to production of TNF- α and IL-6 after treatment with glycerol. The experimental groups were divided into three groups. Group 1 was normal mouse. Group 2 was not treatment with squalene after intramuscular injection of glycerol (50 %, 8 ml/kg). And,

Group 3 was treated with squalene (180 mg/kg) after intramuscular injection of glycerol (50 %, 8 ml/kg). All groups were used to 10 mice.

The supernatants or tissue were analyzed for TNF- α and IL-6 by a using a commercial ELISA kit (Minneapolis, USA) according th the manufacturer' s guidelines.

In vitro results, SQ did not affect on the LDH and NO production by itself. At 6 hour, the production of TNF- α was affected compared with only glycerol group ($p < 0.05$). But, at 24 hour, the production of TNF- α did not affected. On the other hand, IL-6 was affected compared with glycerol only at 24 hour ($p < 0.05$).

In vivo results, SQ was decreased the glycerol-induced TNF- α and IL-6 production compared with glycerol only at 48 and 72 hours ($p < 0.05$).

It was concluded that SQ will increase the immune response on the glycerol induced-renal damage.

서 론

신장은 독성물질, 빈혈, 재관류(reperfusion)-유도 상해 등 여러 가지 원인으로 인하여 급성신부전(acute renal failure(ARF))이 발생되어지면 사구체여과 기능, 신장 독성, 관 손상, 이온의 흡수 및 배설 기능에 영향을 받는다(Lin., 2006, Vexler *et al.*, 1996, Hori *et al.*, 1985). 급성신부전(ARF)를 효율적으로 억제하고 예방하기 위해서 임상에서는 dopamin, prostaglandin A₁ & E₁, 칼슘 길항제, 이뇨제, dimercaprol, penicillamine, leucovorin, 탄산수소나트륨과 allopurinol, vitamin E, Pentoxifylline 등이 임상적으로 실험 되고 있다(Tekin *et al.*, 2000).

일산화질소(Nitric oxide(NO))는 반감기가 6~60초 정도의 불안정한 무기가스로 사람을 포함한 고등동물 뿐만 아니라 하등동물에서도 합성되며 합성된 일산화질소는 생체내의 신호 전달 물질로 수많은 생리적 과정에 관여한다고 알려져 있다(Snyder *et al.*, 1992). 또한 생리 병리학적 많은 과정 중에 관여된 물질로 NO synthases (NOS)라 불리우는 효소에 의해 L-arginine에서 합성되어진다(Eduardo *et al.*, 1995, Moncada., 1992). NOS에는 Ca²⁺-의존성(eNOS & nNOS)과 Ca²⁺-비의존성(iNOS)으로 나누어진다(Schmidt & Murad., 1991). NO는 평활근, 대식세포를 포함한 다양한 세포내에서 glomerular mesengial 세포의 성장과 mitogenesis 억제 및 대식세포 독성, TNF- α 와 bacterial Lipopolysaccharide (LPS) 자극에 의한 neuronal PC12 세포의 apoptosis 조절, 돼지 신장 근위세뇨 RDPase 방출 조절 등 면역병리 과정에 관여한다(Eduardo *et al.*, 1995, Moncada., 1992, Rupprecht *et al.*, 2000, Lakics & Vogel., 1998, Heneka *et al.*, 1998, Park *et al.*, 2002). NO가 필요 이상으로 생성되어지면 shock에 의한 저혈압증, 돌연변이, 신경조직 손상 등이 유발되기도 한다(Knoeles & Moncada., 1992, Nathan., 1992).

Tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)는 분자량이 25 kDa, cachectin으로 알려진 물질로 기전이 아직도 정확히 규명되지는 않았지만, 주로 단핵세포와 대식세포에서 생산되고, 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증유도매개 싸이토카인으로 세

포의 성장과 분화, apoptosis, necrosis 등의 기능에 관여하며 혈관 투과성을 증가시킨다(Jeong *et al.*, 2004, Hur & Park., 2004, Aggarwal *et al.*, 1985). TNF- α 는 미생물 감염 시 발현량이 증가하고, 식세포의 싸이토카인 분비 증가를 유도하여 미생물에 대한 숙주세포의 항상성을 유지하는 중요한 방어기전 역할을 담당한다. 종양 발생 시 세포고사를 유도하여 종양 발생의 감시 기전으로 이용되기도 하고, 호중구 조절, Major histocompatibility complex (MHC) 발현의 조절, B세포 증식, angiogenesis 유도 및 대식세포 활성화 기능을 가지고 있다(Han *et al.*, 1995, Agarwal *et al.*, 1988). 그러나, 다량의 TNF- α 발현은 심근 수축력 감소, 혈압 강하, 대사 과정의 손상을 유발하기도 한다(Vicek & Lee., 1991, Beutler & Cerami., 1989, Eigler *et al.*, 1997).

Interleukin-6 (IL-6)는 분자량이 21 kDa, 212개 아미노산 잔기로 이루어진 다양한 기능을 가진 단백질로 대식세포와 T-세포에 의해서 생산된다(Hirano *et al.*, 1986, Stavros *et al.*, 1996). IL-6는 TNF- α 와 IL-1과 함께 급성기 단백질반응의 유도체로서 anti-inflammatory와 pro-inflammatory cytokine으로 알려져 있다(Steven & Vera., 2000). IL-6는 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), interferon-gamma (IFN-gamma), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)와 같은 pro-inflammatory cytokine의 생산을 억제하는 작용을 가지고 있다. 또한, IL-6는 CD⁴⁺ T-세포, cytotoxic T-세포 분화와 NK (Natural Killer) 세포 기능을 자극하고, IL-1ra 합성과 수용성 TNF 수용체 방출을 유도하는 작용을 가지고 있다(Barton., 1997, Van., 1990, Tilg *et al.*, 1994)

Squalene (hexamethyltetracosahexane, C₃₀H₅₀, SQ)은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구물질로서, 6개의 이중결합이 있어 산소이온과 쉽게 결합할 수 있고, 심해 상어의 간, 올리브유 등에 많이 함유된 탄화수소로 피부, 복부지방조직, 피하지방조직, 림프절, 췌장 및 심근 등에 다량 함유되어 있다(Liu *et al.*, 1976, Yolanda *et al.*, 2005, Yumiko *et al.*, 1997). 스쿠알렌은 상처 치유, 혈관 확장, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 간질환 등에 효과가 있으며(Budiarso, 1990), 항암효과 (Yamawaki *et al.*, 1978), 세포면역 반응 조절 및 항산화제 활성화 효과(Storm *et al.*, 1993), 급성신부전 유도 생쥐에서 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF) 활성화 효과(Kim *et al.*, 2005)가 있음이 보고되

었다.

본 연구에서는 생쥐에 glycerol를 이용하여 Acute renal failure(ARF)를 유도한 후, 스퀴알렌 처치 후 싸이토카인 중 조직 내 염증 반응 및 면역에 관여하는 NO, TNF- α 와 IL-6의 생성 정도와 신장 조직 회복에 관해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium(이하, DMEM이라 함, WelGENE Inc, KOREA), Fetal Bovine Serum (이하, FBS 라 함, Wel GENE Inc, KOREA), Phosphoric acid solution (Daejung, Korea), Glycerol solution (Daejung, Korea), Bicinchoninic acid (이하, BCA라 함) protein assay kit(Pierce, U.S.A.), Sodium nitrate (Sigma, U.S.A.), sulfanilamide (Sigma, U.S.A.), N-(naphthyethylene)diamine (Sigma, U.S.A.), Lactate dehydrogenase(이하, LDH 라 함) 측정 kit는 Roche사(Germany), TNF- α , IL-6에 대한 단클론항체(monoclonal antibody)의 ELISA Kits(R&D systems, MIN, U.S.A)를 사용하였다.

2. 실험 동물

실험동물은 샘타코(한국)에서 생산, 공급하고 있는 ICR계 생쥐 (체중 25-35 g)를 사용하였다. 생쥐는 23 ± 2 °C, 습도는 45 ± 5 %로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장 (40× 25× 17 cm)에서 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취 시켰다. 스키탈렌은 (주)세모(한국) 제품을 사용하였다.

3. 세포배양

renal cell인 Renca 세포주는 한국세포주은행(KCLB, KOREA)에서 구입하였으며, DMEM에 10 % FBS, 100 u/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

4. LDH 측정

Renca 세포주로부터 생성된 LDH 활성을 측정하여 정량화 하였다. 준비된 정상 Renca 세포(2×10^5 cell)에 각각 Glycerol (4 mM, Junsei Co, Japan, Kim *et al.*, 2005), SQ (0.1 %)를 농도별로 각각 첨가 한 후, 시간대(6, 24 시간째)별로 LDH를 측정하였다. 실험 방법은 다음과 같다. 각 군별로 Supernatant 100 μ L를 취해서 96-well microplate에 분주하였다. Kit (Roche, Indianapolis, USA)에 있는

reaction mixture를 각 well에 100 μ L씩 주입한 후, 30 분 이상 실온에서 차광 상태에서 보관하면서 반응시켰다. microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 490 nm에서 측정하였다.

5. NO 측정

준비된 정상 Renca 세포에(2×10^5 cell)에 각각 Glycerol (4 mM, Junsei Co, Japan), SQ (0.1 %)를 농도별로 각각 첨가 한 후, 시간대(6, 24 시간째)별로 NO를 측정하였다. 실험 방법은 다음과 같다. Renca 세포에서 생성된 NO의 양은 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent (0.8 % sulfanilamide/0.75 % N-(naphthylethylene) diamine in 0.5N HCl, Sigma) 100 μ L를 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate (0.5~100 M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

6. Glycerol과 SQ 처리(*in vitro*의 경우)

준비된 정상 Renca 세포에(2×10^5 cell)에 각각 Glycerol (4 mM, Junsei Co, Japan), SQ (0.1 %)를 각각 첨가 한 후, 시간대(6, 24 시간째)별로 TNF- α , IL-6 생성 정도를 측정하였다.

7. Glycerol과 SQ 처리(*in vivo*의 경우)

glycerol (50 %, 8 ml/kg, Mohammad & Adebayo., 2002)은 근육 주사를 통해 주입하였다. SQ (80 ml/kg)는 glycerol 처치 30분 경과 후, 복강을 통해 주입하였다. 실험군은 다음과 같다. 실험군 1은 glycerol만 단독 처치군, 실험군 2는 glycerol 처치 후, SQ를 1회만 처치한 군, 실험군 3은 glycerol 처치 후 SQ를 1일 1회 처치한 군 등으로 24, 48, 72 시간째에 생쥐의 신장을 적출하였고, 각 실험군 당 생쥐 10마리를 사용하였다.

8. Glycerol -유도 Cytokines의 측정

TNF- α , IL-6등의 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 테이프로 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 테이프로 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(microreader: 450 nm, wavelength correction: 570nm, U.S.A.).

9. 단백질 함량 측정

단백질 농도는 BCA protein assay kit를 이용하였다. BCA를 표준물질로 사용하여 각각의 단백질 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.

10. 통계처리

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

결 과

1. *In vitro* 결과

(1) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치에 의한 LDH 결과

Renca세포에 SQ, Glycerol를 세포배양액에 첨가·배양한 후, LDH를 측정하였다. 세포배양액만 단독으로 처리한 정상군에 비해 SQ (0.1 %)를 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 86.4± 7.6, 70.1± 15.7 % 를 보여 정상군과 큰 차이를 보이지 않았다. Glycerol (4 mM)을 세포배양액에 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 225.3± 35.2 %, 224.9± 11.3 %를 보여 정상군에 비해 높은 LDH 생산이 관찰되었다(Table 1, Figure. 1).

Table 1. Analysis of cytoprotective effect of SQ or glycerol in cultured Renca cell. (unit: %)

<i>Groups</i> <i>Times(hours)</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>
6	225.3±35.2	86.4±7.6
24	224.9±11.3	70.1±15.7

The cytoprotective effects was analyzed with the amount of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured Renca cells (2×10^5 /well).

Group 1. The only glycerol (4 mM) was added with cultured medium.

Group 2. The only SQ (0.1 %) was added with cultured medium.

(2) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치에 의한 NO 결과

Renca세포에 SQ, Glycerol를 세포배양액에 첨가·배양한 후, NO를 측정하였다. 세포배양액만 단독으로 처리한 정상군의 경우 0.20 ± 0.04 , 0.14 ± 0.04 ($\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)를 보였다. SQ (0.1 %)를 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 0.25 ± 0.03 , 0.21 ± 0.03 (%)를 보여 정상군과 큰 차이를 보이지 않았다. Glycerol (4 mM)를 세포배양액에 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 0.27 ± 0.05 , 0.23 ± 0.03 을 보여 이들 물질이 NO 생산에는 효과가 없는 것으로 관찰되었다(Table 2, Figure. 2).

Table 2. The effects of SQ or glycerol on the NO production in cultured Renca cells. (unit: $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein)

<i>Groups</i> <i>Times(hours)</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>
6	0.20 ± 0.04	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.03
24	0.14 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03

Group 1. The only cultured medium was used.

Group 2. The only glycerol (4 mM) was added with cultured medium.

Group 3. The only SQ (0.1 %) was added with cultured medium.

(3) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치에 의한 TNF- α 생성 결과

Renca세포에 SQ, Glycerol를 세포배양액에 첨가·배양한 후, TNF- α 발현량 측정하였다. 세포배양액만 단독으로 처리한 정상군의 경우 200.0 \pm 24.2, 400.0 \pm 32.4(pg/mL)을 보였다. Glycerol (4 mM)를 세포배양액에 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 2536.7 \pm 190.7, 2239.3 \pm 250.7, Glycerol (4 mM)과 SQ (0.1 %)를 세포배양액에 함께 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 1761.4 \pm 110.6, 1908.2 \pm 111.4로 glycerol 단독 처리군에 비해 6 시간째에 TNF- α 생성량을 감소시킴을 관찰하였다 (Table 3, Figure. 3, p<0.05).

Table 3. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in cultured Renca cells. (unit: pg/mL)

<i>Times(hours)</i> \ <i>Groups</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>
6	200.0 \pm 24.2	2536.7 \pm 190.7	1761.4 \pm 110.6*
24	400.0 \pm 32.4	2239.3 \pm 250.7	1908.1 \pm 111.4

*p<0.05 compared with glycerol.

Group 1. The only cultured medium was used.

Group 2. The only glycerol (4 mM) was added with cultured medium.

Group 3. The SQ (0.1 %) was added with cultured medium after injection glycerol.

(4) Renca 세포주를 이용한 glycerol, SQ 처치에 의한 IL-6 생성 결과

Renca세포에 SQ, Glycerol를 세포배양액에 첨가·배양한 후, IL-6 발현량 측정하였다. 세포배양액만 단독으로 처리한 정상군의 경우 0.07 ± 0.01 , 0.08 ± 0.02 (pg/mL)를 보였다. Glycerol (4 mM)를 세포배양액에 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 5.59 ± 0.18 , 17.54 ± 2.59 , Glycerol (4 mM)과 SQ (0.1 %)를 세포배양액에 함께 처리한 군의 경우 6, 24 시간째 4.74 ± 0.03 , 10.30 ± 1.49 로 glycerol 단독 처리군에 비해 24 시간째에 IL-6 생성량을 감소시킴을 관찰하였다(Table 4, Figure. 4, $p < 0.05$).

Table 4. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in cultured Renca cells. (unit: pg/mL)

<i>Times(hours)</i> \ <i>Groups</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>
6	0.07 ± 0.01	5.59 ± 0.18	4.74 ± 0.03
24	0.08 ± 0.02	17.54 ± 2.59	$10.30 \pm 1.49^*$

* $p < 0.05$ compared with glycerol.

Group 1. The only cultured medium was used.

Group 2. The only glycerol (4 mM) was added with cultured medium.

Group 3. The SQ (0.1 %) was added with cultured medium after injection glycerol.

2. *In vivo* 결과

(1) 생쥐 신장에서 glycerol 유도 TNF- α 생성에 관한 SQ의 효과

생쥐에 근육 주사를 통해 glycerol (50 %, 8 ml/kg)를 주입한 후, SQ (80 ml/kg)처치가 신장 조직에서의 TNF- α 발현량에 어떠한 영향을 미치는 지를 시간대로 관찰하였다. Glycerol만 단독 처치한 군의 경우 24, 48, 72 시간째에 8.27 ± 1.48 , 8.23 ± 2.10 , 6.22 ± 1.48 (pg/mG)을 보였다. Glycerol를 주입하고, SQ를 1회만 주입한 군의 경우 7.65 ± 0.90 , 6.48 ± 2.00 , 6.21 ± 0.40 으로 Glycerol 단독 처치 군과 큰 차이를 보이지는 않았다. Glycerol를 주입하고, SQ를 1일 1회 주입한 군의 경우 7.65 ± 0.90 , 4.10 ± 0.48 , 3.10 ± 0.45 로 Glycerol 단독 처치 군에 비해 48, 72 시간째에 TNF- α 생성량이 감소함을 관찰하였다(Table 5, Figure. 5, $p < 0.05$).

Table 5. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in mice kidney. (unit: pg/mG)

<i>Times(hours)</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>
24	8.27±1.48	7.65±0.90	7.65±0.90
48	8.23±2.10	6.48±2.00	4.10±0.48*
72	6.22±1.48	6.21± 0.40	3.10±0.45*

*p<0.05 compared with glycerol.

Group 1. Glycerol (50 %, 8 ml/kg) was injected by i.m.

Group 2. SQ (80 ml/kg) was injected once after glycerol injection.

Group 3. SQ (80 ml/kg) was injected once a day after glycerol injection.

(2) 생쥐 신장에서 glycerol 유도 IL-6 생성에 관한 SQ의 효과

생쥐에 근육 주사를 통해 glycerol (50 %, 8 ml/kg)를 주입한 후, SQ (80 ml/kg)처치가 신장 조직에서의 IL-6 발현량에 어떠한 영향을 미치는 지를 시간대로 관찰하였다. Glycerol만 단독 처치한 군의 경우 24, 48, 72 시간째에 3.81 ± 0.46 , 3.16 ± 0.43 , 1.91 ± 0.45 (pg/mG)을 보였다. Glycerol를 주입하고, SQ를 1회만 주입한 군의 경우 3.05 ± 1.40 , 2.23 ± 0.90 , 1.96 ± 0.20 로 Glycerol 단독 처치 군과 큰 차이를 보이지는 않았다. Glycerol를 주입하고, SQ를 1일 1회 주입한 군의 경우 3.05 ± 1.40 , 1.73 ± 0.19 , 1.74 ± 0.10 로 Glycerol 단독 처치 군에 비해 48 시간째에 IL-6 생성량이 감소함을 관찰하였다(Table 6, Figure. 6, $p < 0.05$).

Table 6. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in mice kidney. (unit: pg/mG)

<i>Times(hours)</i> \ <i>Groups</i>	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>
24	3.81±0.46	3.05±1.40	3.05±1.40
48	3.16±0.43	2.23±0.90	1.73±0.19*
72	1.91±0.45	1.96±0.20	1.74±0.10

*p<0.05 compared with glycerol.

Group 1. Glycerol (50 %, 8 ml/kg) was injected by i.m.

Group 2. SQ (80 ml/kg) was injected once after glycerol injection.

Group 3. SQ (80 ml/kg) was injected once a day after glycerol injection.

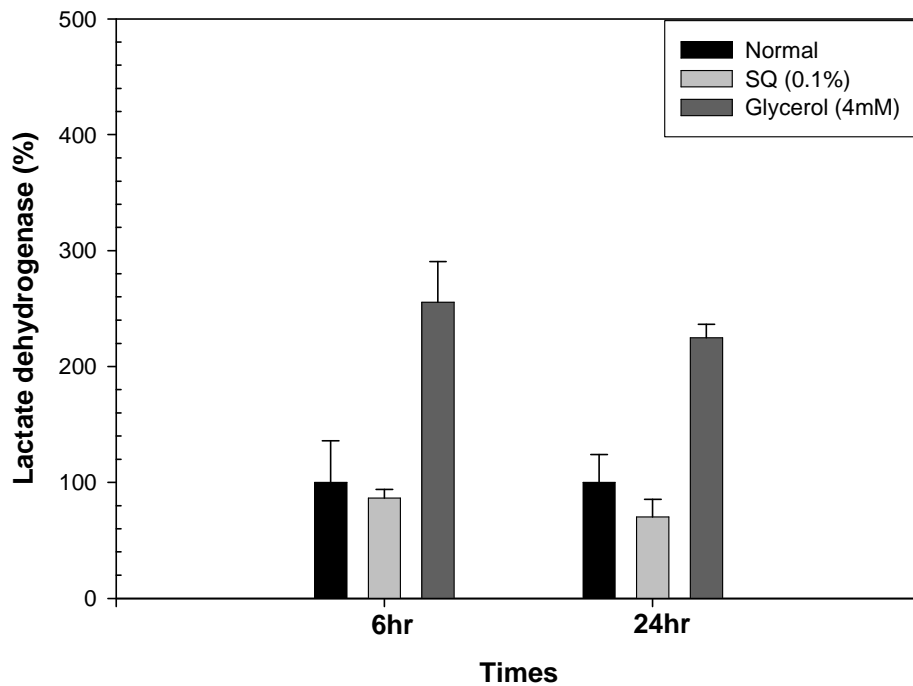


Fig. 1. Analysis of cytoprotective effect of SQ (0.1 %) or glycerol.

The cytoprotective effects was analyzed with the amount of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured Renca cells (2×10^5 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.

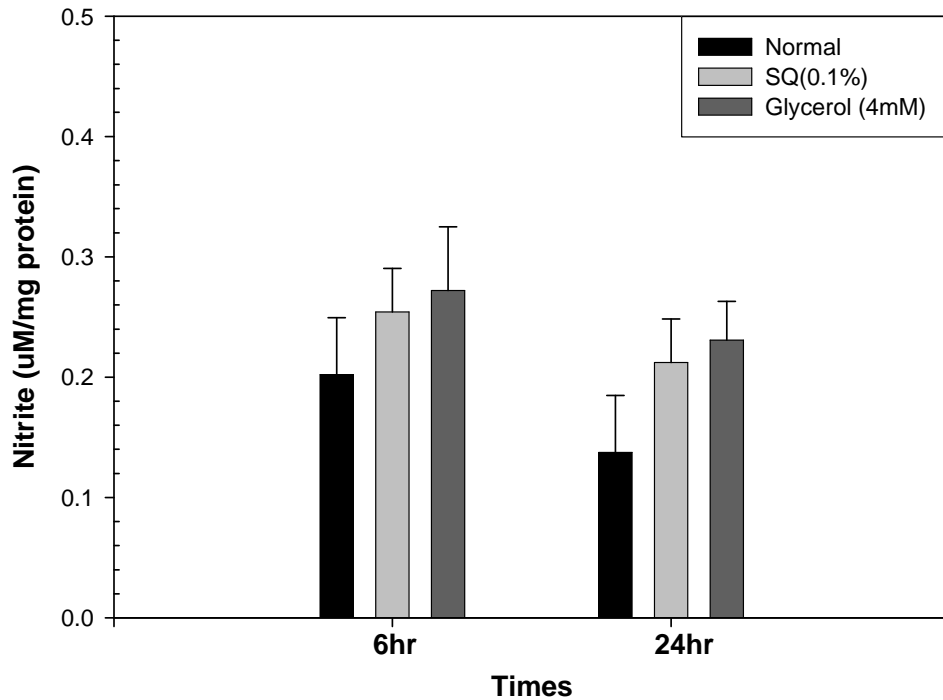


Fig. 2. The effects of SQ (0.1 %) or glycerol (4 mM) on the NO production in cultured Renca cells (2×10^5 /well).

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

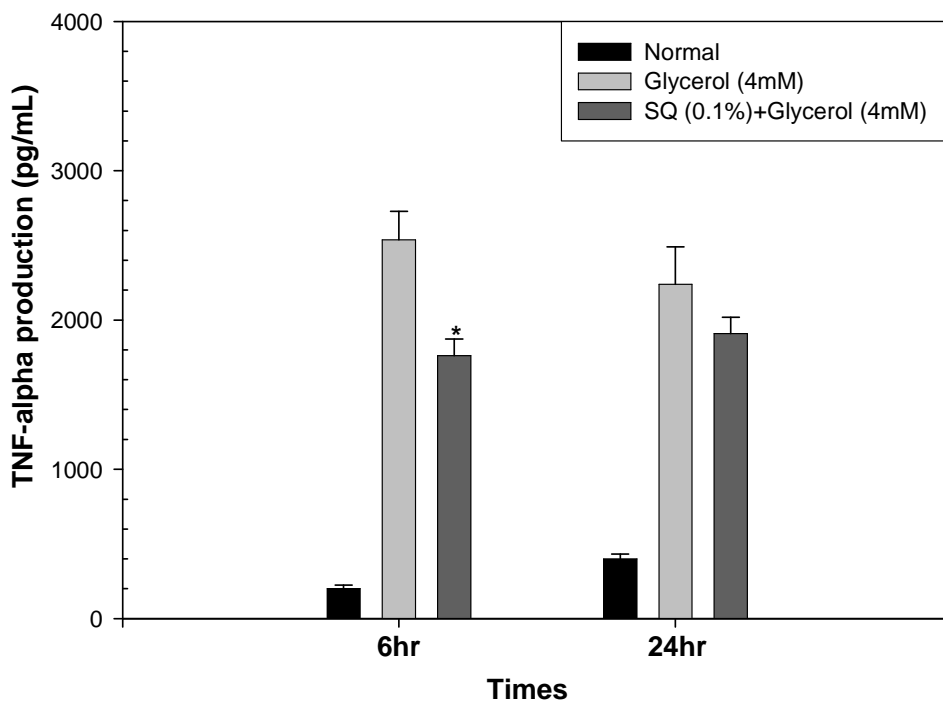


Fig. 3. The effects of SQ (0.1 %) on the glycerol-induced TNF- α production in cultured Renca cells (2×10^5 /well).

Each groups were cultured during the 6 or 24 hours after treated with glycerol (4 mM). 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 glycerol group data by ANOVA test (* $p < 0.05$).

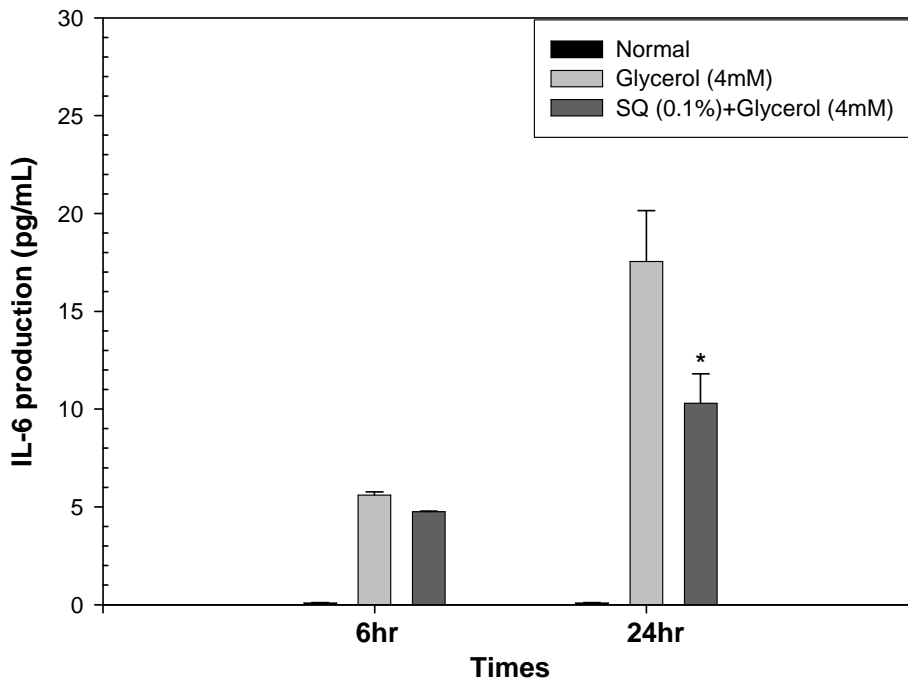


Fig. 4. The effects of SQ (0.1 %) on the glycerol-induced IL-6 production in cultured Renca cells (2×10^5 /well).

Each groups were cultured during the 6 or 24 hours after treated with glycerol (4 mM). 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 glycerol group data by ANOVA test (* $p < 0.05$).

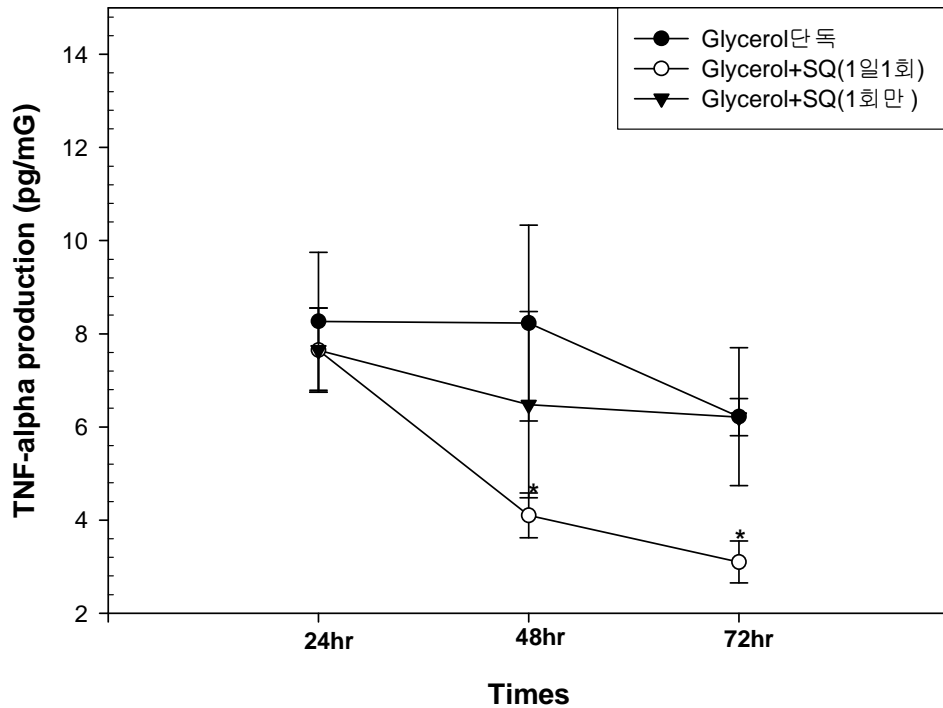


Fig. 5. The effects of SQ on the glycerol-induced TNF- α production in mice kidney.

Each groups were killed during the 24, 48 or 72 hours after treated with glycerol (50 %, 8 ml/kg) or SQ (80 ml/kg). And TNF- α was assay by ELISA kit. Statistically significant value compared with only treated with glycerol group data by ANOVA test (* $p < 0.05$).

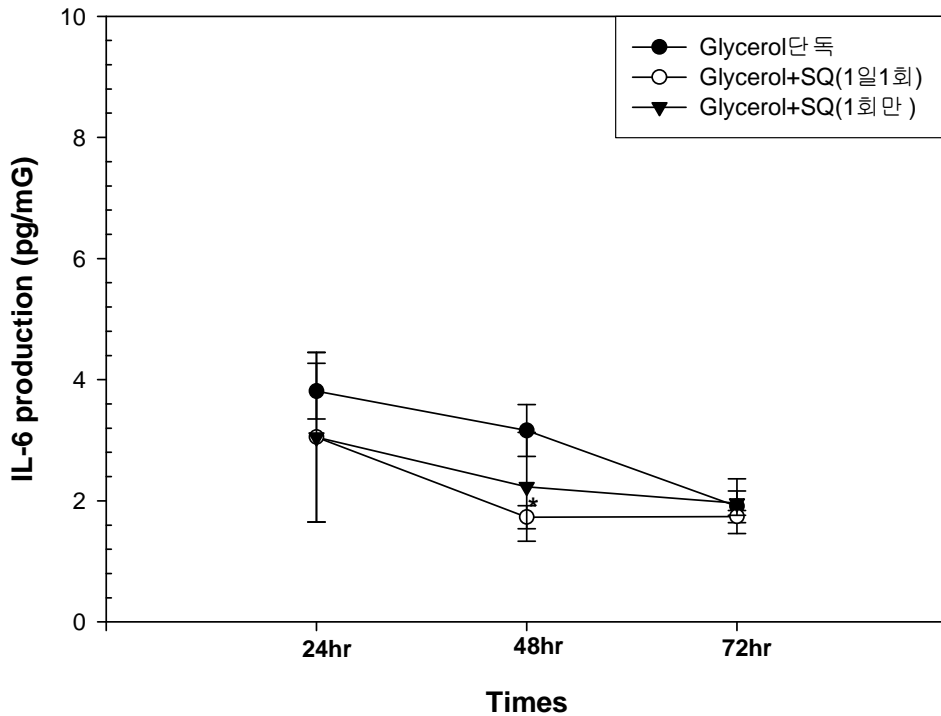


Fig. 6. The effects of SQ on the glycerol-induced IL-6 production in mice kidney.

Each groups were killed during the 24, 48 or 72 hours after treated with glycerol (50 %, 8 ml/kg) or SQ (80 ml/kg). And IL-6 was assay by ELISA kit. Statistically significant value compared with only treated with glycerol group data by ANOVA test (* $p < 0.05$).

고 찰

Glycerol, mercury chloride, amino glycoside, uranyl nitrate 등은 acute renal failure (ARF)를 유도하는데 많이 이용 되어지는 물질 중 하나로 신장 조직 내 관 괴사, 빈혈, 혈관 수축, 사구체 여과율 감소, P-glycogen 기능 저하, 양이온-음이온의 관 분비 억제 및 기타 신장 기능의 억제 현상 등이 관찰되어진다 (Tekin *et al.*, 2000, Karam *et al.*, 1995, Mandal *et al.*, 1989, Venkatachalam *et al.*, 1976, Mohammad & Adebayo., 2002, Gal *et al.*, 2002, Sawaya *et al.*, 1997, Zhao *et al.*, 2000, Zurovsky., 1993)

Acute renal failure (ARF)의 효과에 관한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며 Devinder (2004) 등의 보고에 의하면 acute renal failure (ARF)를 유도하는 물질인 glycerol을 주입하기 60분 전에 Naringin (100, 200, 400 mg/kg)을 쥐에 주입시켰을 때 농도가 증가 할수록 glycerol-유도 acute renal failure (ARF)를 경감시키는 효과가 있었고 또한, Shulman(1993)등의 보고에서는 glycerol을 주입하기 바로 전에 anti-TNF-alpha antiserum(200 μ l/300 g body weight)을 주입하면 신장 기능을 보호하는 효과가 있다고 하였다. 본 연구에서도 glycerol-유도 ARF를 경감시키기 위하여 스쿠알렌을 *in vitro*상에서는 스쿠알렌 (0.1 %)을 6, 24시간대 별로 처리 하였고 *in vivo*상에서는 스쿠알렌 (80 ml/kg)을 24, 48, 72시간대별로 처리하여 관찰하였다.

glycerol을 처리하여 ARF를 유도하기 전에 스쿠알렌에서의 세포독성을 알아보기 위해 LDH (Lactate dehydrogenase)를 측정하였고 측정결과 본 연구에서는 glycerol (4 mM)은 정상군에 비해 높은 LDH (Lactate dehydrogenase)를 생성하여 세포독성이 있는 것으로 관찰되었으나, 스쿠알렌 (0.1 %)은 정상군에 비해 LDH 생성에는 큰 차이를 보이지 않아 세포 독성이 없는 것으로 관찰되었다. LDH (Lactate dehydrogenase)에 대한 보고(Cho., 2000)에 의하면 카드뮴에서의 LDH (Lactate dehydrogenase) 활성치는 카드뮴 1 μ g 첨가군에서 10.71 %, 25 μ g 첨가군에서 27.21 %, 50 μ g 첨가군에서 42.98 %로 카드뮴 첨가농도에 따라 용량 의존적으로 높아지는 경향이였다. 특히 카드뮴 농도가 25 μ g 이상 일 때 독성 영향이

있음을 보고하였다. 홍삼 및 백삼 사포닌(50~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 각각 교세포(glial cells)에 첨가한 후, LDH (Lactate dehydrogenase)를 측정하면 홍삼 사포닌 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 백삼 사포닌 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 LDH (Lactate dehydrogenase)가 대조군에 비해 적게 분비 되었으며(Sung *et al.*, 2004) 또한, 대식세포인 RAW264.7 세포에 Alkoxy Glycerol (AG) 및 Batyl, Chimyl(Alkoxy Glycerol의 주요성분) 용액을 세포배양액에 첨가배양한 후, LDH (Lactate dehydrogenase)를 관찰하면 배양액만 단독으로 처리한 정상군에 비해 실험에 관련된 용액을 함께 처리한 군의 경우 차이를 보이지 않아 세포독성이 거의 없는 것으로 관찰 되었고, 곰팡이성 병원균의 일종인 *Candida albicans* ($3 \times 10^5/\text{mL}$)를 세포에 처리한 군은 높은 LDH (Lactate dehydrogenase) 생성이 관찰되어 세포 독성이 있는 것으로 관찰 되었다(Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서는 앞에서 언급한 바와 같이 정상군에 비해 LDH 생성이 적어 독성이 관찰 되지 않았으므로 스쿠알렌은 안정된 물질이라고 사료되어 본 연구를 시작하였다.

Nitric Oxide(NO)는 암세포나 대식세포에서 감염된 미생물에 대한 cytotoxic agent로서 면역학적으로 작용 한다고 보고하였다(Hibbs *et al.*, 1987, Stuehr & Nathan., 1989). Nitric Oxide(NO)에 관한 연구에서는 단삼(丹蔘) 용액이 면역세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는 가에 대하여 알아보기 위하여 쥐의 복강 내에 있는 macrophage에서 생성되는 Nitric Oxide(NO)를 측정 한 결과 *in vitro* 상에서는 단삼용액을 처리하였을 때 면역세포 증식이 억제되고, *in vivo* 상에서는 유효한 차이가 관찰되지 않았다(陳 등., 1998). RAW 264.7 세포주에 lipopolysaccharide (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{L}$) 유도 염증 반응을 유발 시킨 후, 오가피(1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 첨가하여 배양하면 Nitric Oxide(NO) 생성량을 관찰한 결과 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 첨가해 준 군에서 Nitric Oxide(NO) 생성량이 감소하였다고 보고하였다(Yee *et al.*, 2000). 그리고, RAW 264.7 세포에 Alkoxy Glycerol (AG) 및 Alkoxy Glycerol (AG)의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가배양한 후, Nitric Oxide(NO) 발현량을 배양 6, 24 시간 후에 각각 관찰한 실험의 경우 Nitric Oxide(NO)는 6, 24 시간 배양 후 정상 군에 비해서는 약간의 증가 경향을 보였으나 *Candida albicans*의 단독 처리 군에 비해 거의 차이를 나타내지 않아 이들 물질이 Nitric Oxide(NO) 생산에는 효과가 없는 것으로 관찰되었다(Kim *et*

a.l., 2005). *Discorea daemon* Roxb. 줄기 메탄올 추출물(DD)을 200 mg/kg 용량으로 3주간 경구 투여하여 항염증 활성을 측정한 결과 메탄올 추출물(DD)과 그 분획물 들은 4~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포 독성을 나타내지 않고 lipopolysaccharide(LPS)가 유도한 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide(NO) 생성을 억제 한다고 보고하였다(Choi & Koo, 2005). RAW264.7 세포에 고분자 수용성 chitosan (water-soluble chitosan, WSC, M.W. 300,000 Da, DAC>90 %)을 첨가하면(0.1, 1 mg/ml) 그 자체로는 Nitric Oxide(NO) 생성에 효과가 없지만, rIFN- γ 와 chitosan을 혼합하여 세포에 처리하면 water-soluble chitosan(WSC) 농도에 비례하여 배양 24 시간 후부터는 Nitric Oxide(NO)생성이 증가 되었다(Jeong *et al.*, 2000). 그리고 현삼(玄蔘)의 메탄올 추출액(SRE)을 Raw 264.7 세포주에 농도별 (0.1, 0.3 mg/mL)로 5, 12, 18, 24시간 동안 각각 처리하면 lipopolysaccharide(LPS) 유도 Nitric Oxide(NO) 생성이 증가가 보고 되었다(Byun *et al.*, 2005). 본 연구에서는 glycerol (4 mM), 스쿠알렌 (0.1 %)이 6 시간째에는 Nitric Oxide(NO)생성이 정상 군과 오차 범위 내에 있어 큰 차이를 보이지 않았으나, 24 시간째에는 정상 군에 비해 약간 높은 Nitric Oxide(NO) 생성이 관찰되었다.

TNF- α 는 lipopolysaccharide(LPS)나 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)의 자극에 의해 macrophage 또는 monocyte로부터 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine으로서(Manogue *et al.*, 1992) 생성된 종양세포의 괴사와 apoptosis 등을 유도하는 antitumor 물질로 알려져 있었으나 최근에는 많은 질환들에서 TNF- α 의 병리적 역할이 증명되면서 알레르기나 염증반응의 주요 매개물질로 이해되고 있다(Lee.,2001). 쿠퍼세포에 β -1,3 glucan 성분을 첨가하여 배양하면 β -1,3 glucan 성분의 농도 증가에 비례하여 Nitric Oxide(NO)와 TNF- α 의 양적 증가를 유발시켰고(Han *et al.*,1999), 영지버섯에서 분리한 단백다당체를 생쥐 대식세포에 넣고 배양하면 TNF, IL-1과 IL-12 생성량이 대조군에 비해 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 증가되었다(Bae.,1997). Lactoferrin은 L929 및 RAW 264.7 세포주에 농도별(1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$)로 첨가하여 배양하면 TNF- α 분비량이 증가하고, lipopolysaccharide(LPS) 자극에 의해 분비되는 TNF- α 의 생성량은 감소시키는 효과를 가지고 있었다(Lee *et al.*, 2001). 또한 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 처리 하면 lipopolysaccharide(LPS) 유도 TNF- α 생성이 증가하나, 현삼 추출액은 TNF- α 생성량을 유의하게 감소시키는 효과가 있다(Byun *et al.*, 2005). 그리고 RAW264.7 세포에 Alkoxy Glycerol (AG) 및 Alkoxy Glycerol (AG)의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가·배양한 후, TNF- α 발현량을 배양 6, 24 시간 후에 각각 관찰하면 배양 6 시간째 군에서는 생성에 특별한 변화가 없었으나, 24 시간째 군에서는 batyl, chimyl 용액을 첨가한 군에서 정상 군에 비해 생성이 증가하는 경향을 보여 두 용액이 TNF- α 생성량에 영향을 준다고 보고하였다.(Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서는 *in vitro* 실험의 경우 glycerol (4 mM)만 단독 처리한 군에 비해 스쿠알렌 (0.1 %)을 함께 처리한 군에서 6 시간째에 TNF- α 생성량을 크게 감소시켰으나, 24 시간째에는 별다른 차이를 보이지 않아 스쿠알렌이 단시간에 효과가 있음을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$). 또한, *in vivo* 실험의 경우 glycerol (50 %, 8 mL/kg)를 단독 처리한 군에 비해 glycerol 처치 후, 스쿠알렌 (80mL/kg)을 1일 1회 처리한 군에서 생쥐 신장에서 48, 72 시간째에 TNF- α 생성량이 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$), 스쿠알렌 (80 mL/kg)을 1회만 처치한 군에서는 별다른 차이를 관찰 할 수 없어서 스쿠알렌의 지속적인 투여가 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

RAW264.7 세포에 Alkoxy Glycerol (AG) 및 Alkoxy Glycerol (AG)의 주요 성분인 Batyl, Chimyl 용액을 세포배양액에 첨가배양한 후, IL-6 발현량을 배양 6, 24 시간 후에 각각 관찰하면, 배양 6 시간째 군에서는 생성에 특별한 변화가 없었으나, 24 시간째 군에서는 Alkoxy Glycerol (AG), batyl, chimyl 용액을 첨가한 군에서 모두 생성량이 정상군에 비해 증가하는 경향을 보여 모든 용액이 IL-6 생성량에 영향이 있음을 보고하였다(Kim *et al.*, 2005). 또한, 현삼(玄蔘)의 메탄올 추출액(SRE)을 Raw 264.7 세포주에 농도별(0.1, 0.3 mg/mL)로 5, 12, 18, 24시간 동안 각각 처리하면 lipopolysaccharide(LPS) 유도 IL-6 생성량이 증가하지만, 현삼 추출액은 IL-6 분비에는 효과가 없다고 보고 하였다(Byun *et al.*, 2005). 본 연구에서는 *in vitro* 실험의 경우 glycerol (4 mM)만 단독 처리한 군에 비해 스쿠알렌 (0.1 %)을 함께 처리한 군에서 6 시간째에는 IL-6 생성량에 변화가 없었으나, 24 시간째에는 IL-6 생성량을 크게 감소시킴을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$). 또한, *in vivo* 실험의 경우 glycerol (50 %, 8mL/kg)를 단독 처리한 군에 비해 glycerol 처

치 후, 스쿠알렌 (80 ml/kg)을 1일 1회 처리한 군이 생쥐 신장에서 48 시간째에만 IL-6 생성량이 유의하게 감소하였으나($p < 0.05$), 스쿠알렌 (80 ml/kg)을 1회만 처리한 군에서는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 본 연구를 통해서 급성신부전을 유발시킬 수 있는 물질 중 하나인 glycerol에 의해 유도되어 지는 싸이토카인의 분비 억제에 스쿠알렌 처치가 효과가 있었으며 면역증진 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

국문요약

신장에 급성신부전이 발생되어지면 사구체여과 기능, 신장 독성, 관 손상, 이온의 흡수 및 배설 기능에 영향을 받는다.

NO는 mitogenesis 억제 및 대식세포 독성, TNF- α 와 LPS 자극에 의한 apoptosis 조절, 신장 근위세뇨 RDPase 방출 조절 등 면역병리 과정에 관여한다.

TNF- α 는 면역반응과 염증반응을 유도하는 염증유도매개 사이토카인으로 apoptosis, necrosis 등의 기능 관여, 미생물 감염 시 발현량이 증가, 식세포의 사이토카인 분비 증가를 유도하여 미생물에 대한 숙주세포의 항상성을 유지하는 중요한 방어기전 역할을 담당한다.

IL-6는 TNF- α 와 IL-1과 함께 급성기 단백질반응의 유도체로서 anti-inflammatory 와 pro-inflammatory cytokine으로 알려져 있다. IL-6는 CD⁴⁺ T-세포, cytotoxic T-세포 분화와 NK(natural killer) 세포 기능을 자극하고, IL-1ra 합성과 수용성 TNF 수용체 방출을 유도하는 작용을 가지고 있다.

스쿠알렌은 콜레스테롤의 생합성에 아주 중요한 선구물질이다. 스쿠알렌은 상처 치유, 동맥경화 억제 작용, 심근경색, 화상 치료, 카드뮴 독성 완화, 항암효과, 섬유아세포 성장인자 활성 효과 등이 있다.

본 연구에서는 생쥐에 glycerol을 이용하여 ARF를 유도한 후, 스쿠알렌 처치후 사이토카인 중 조직내 염증 반응 및 면역에 관여하는 NO, TNF- α 와 IL-6의 생성 정도와 신장 조직 회복에 관해 알아보고자 하였다.

In vitro 실험의 경우 Renca 세포(2×10^5 /well)를 이용하여 세포독성 지표인 LDH, 염증반응의 지표인 NO를 측정하였고, glycerol(4 mM)-유도 사이토카인 중 TNF- α , IL-6를 측정하였다. *In vivo* 실험의 경우 생쥐에 glycerol(50 %, 8 ml/kg)을 근육 주사하고, 스쿠알렌(80 ml/kg) 처치 한 후, glycerol에 의해 유도되어진 TNF- α , IL-6 생성량을 측정하였다.

실험 결과, *in vitro*의 경우 스쿠알렌 자체만으로는 세포독성이 없으며, NO생성에도 큰 영향을 주지 않았다. glycerol-유도 Renca 세포주에서 TNF- α , IL-6의 생성량도 glycerol 단독 처치 군에 비해 유의하게 감소시킴을 관찰할 수 있었다

($P < 0.05$). *In vivo* 실험의 경우 glycerol 단독 처치 군에 비해 스쿠알렌을 1일 1회 처치한 군에서 48, 72 시간째에 TNF- α , IL-6 생성량을 감소시킴을 관찰할 수 있었다($P < 0.05$).

본 연구를 통해서 급성신부전을 유발시킬 수 있는 물질 중 하나인 glycerol에 의해 유도되어 지는 싸이토카인의 분비 억제에 스쿠알렌 처치가 효과가 있어서 면역증진 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Agarwal, S. Drysdale, B.E. and Shin, H.S.. "Tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity involved ADP-ribosylation." *J Immunol* 140,4187-4192, 1988.
- Aggarwal, B.B. Kohr, W.J. Hass, P.E. Moffat, B. Spencer, S.A. Henzel, W.J. Bringman, T.S. Nedwin, G.E. Goeddel, D. and Harkins, R.N.. "Human tumor necrosis factor. production, purification, and characterization." *J Biol Chem* 260,2345-2354, 1985.
- Bae, J.H.. "Effects of *Ganoderma lucidum* on the IL-1, TNF and IL-12 gene expression on macrophage." *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 26(5),978-982, 1997.
- Barton, B.E.. "IL-6: insights into novel biological activities." *Clin Immunol Immunopathol* 85,16-20, 1997.
- Budiarso, I.T.. "Fish oil versus olive oil." *Lancet.* 336,1313-1314, 1990.
- Byun, S.H Yang, C.H. and Kim, S.C.. "Inhibitory effects of scrophulariae radix extracts on TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages." *Kor J Soc Food Sci Nutr* 29(2),342-348, 2005.
- Cho, Y. C., "In Vitro magnetometry, LDH activity and apoptosis Indices of cytotoxicity in alveolar macrophages exposed to cadmium chloride" *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* 26(4),115-121, 2000.
- Choi, E. M. and Koo, S. J., "Effects of *Discorea daemonia* Roxb. stem extract on the inflammatory responses, antioxidant system and lipid levels *in Vivo* and the production of inflammatory mediators in RAW264.7 cells" *J East Asian Soc Dietary Life.* 15(6),707-716, 2005.
- Daniel, P. Matthew, P. and Michael, S.G.. "Therapeutic use of stem and endothelial progenitor cells in acute renal injury." *Current Opinion in*

- Pharmacol* 6(2),176–183,2006.
- Devinder, S. Vikas, C. and Kanwaljit, C.. “Protective effect of naringin, bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney.” *Toxicol.* 201,143–151,2004.
- Dinareello, C.A. Cannon, J.G. Wolff, S.M. Bernheim, H.A. Beutler, B. Cerami, A. Figari, I.S. Palladino, M.A. Jr. and O'connor, J.V.. “Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1.” *J.EXP. MED.* 163(6), 1433–1450, 1986.
- Eddie, N.. “Management of acute renal failure” *American Family Physician.* 72(9), 1739–1746, 2005.
- Eduardo, N. Georg, N. Thomas, F.L.. “Nitric Oxide in Cardiovascular disease.” *Ann Med* 27,343–351,1995.
- Eigler, A. Sinh, B. Hartmann, G. and Endres S.. “Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokines.” *Immunol Today* 18,487–492,1997.
- Gal, M. Scherzer, P. Rubinger, D. Weiss, M. and Popovtzer, M.M.. “Stimulation of osteoclastic bone resorption in a model of glycerol-induced acute renal failure: evidence for a parathyroid hormone-independent mechanism.” *Bone.* 31(4),488–491,2002.
- Han, M.D. Lee, J.W. Jeong, H. Kim, Y.S. Ra, S.J. and Yoon, K.H.. “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, 28–34,1999.
- Heneka, M.T. Loschmann, P.A. Gleichmann, M. Weller, M. Schulz, J. B. Wullner, U. and Klockgether, T.. “Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α / lipopolysaccharide.” *J Neurochem* 71,88–94,1998.
- Hibbs, J.B. Taintor, R.R. and Vavrin, Z.. “Macrophage cytotoxicity : role for

- L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite." *Science*. 235,473-476,1987.
- 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. and Kishimoto, T.. "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* 324,73-76,1986.
- Hori, R. Takano, M. Okano, T. and Inui, T.. "Transport of *p*-amino-hippurate, tetraethylammonium and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure." *J Pharmacol Exp Ther*. 233,776-781,1985.
- Jeong, H.J. Koo, J.N. Oh, E.Y. Chae, H.J. Suh, S.B. Cho, K.H. Park, B.R. Park, S.T. Lee, Y.M. and Kim, H. M.. "Nitric oxide production by high molecular weight water-soluble chitosan via Nuclear factor-KB activation." *Int J Immunopharmacol* 22,923-933,2000.
- Jeong, K.H. Lee, S.H. Lee, Y.J. Kim, M.J. Ko, K.P. Oh, S.J. Woo, J.T. and Kim, Y.S.. " Association of the tumor necrosis factor- α gene polymorphism with end-stage kidney failure." *Kor J Nephrol* 23,439-445,2004.
- Jin, C.H. Kang, C.H. and Jeong H.W.. "Effects of salviae radix on immune cell and cancer cell." *Kor J oriental Med Patholog*. 12(2),125-131,1998.
- Karam, H. Bruneval, P. and Clozel, J.P.. " Role of endothelin in acute renal failure due to rhabdomyosis in rats." *J Pharmacol Exp Ther*. 274,481-486,1995.
- Kim, Y.H. Lee, J.H. Kim, J.S. and Choi, Y.B.. "Effects of Squalene on Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) from the Renal Proximal

- Tubules." *Kor J Gerontol*, 15(2),26-31,2005.
- Kim, Y.H. Yoon, H. J. Moon, M.E. Lee, J.H. Park, H.S. and Kim, J. S.. "Production of NO, TNF- α and IL-6 by Squalene, Alkoxy Glycerol, Batyl and Chimyl solutions in RAW 264.7 macrophage cells." *J Kor Soc Sci Nutr*. 34(10),1503-1508,2005.
- Knowles, R.G. and Moncada, S.. "Nitric oxide as a single in blood vessels." *TIBS* 17,399-402,1992.
- Ko, H.C. and Shin, I.C.. "Effects of glycerol on the oxygen free radical reactions and renal functions in the renal cortex of rats." *J Applied Pharmacol*. 3,260-265,1995.
- Lakics, V. and Vogel, S.N.. "Lipopolysaccharide and ceramide use divergent signaling pathways to induce cell death in murine macrophages." *J Immunol* 161,2490-2500,1998.
- Lee, S.W. Yang, H.J. and Hwangbo, S.. "Effect of lactoferrin from korean native cattle on the production of tumor necrosis factor- α and nitric oxide." *Kor J Food Sci Ani Resour*. 21(4),374-382,2001.
- Lin, F.. "Stem cells in kidney regeneration following acute renal injury." *Int Pediatr Res*. 59(4),74R-78R,2006.
- Lin, Y. Chokisi, S. Shen, H.M. Yang, Q.F. Hur, G.M. Kim, Y.S. Tran, J.H. Nedospasov, S.A. and Liu, Z.G.. "Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation." *The Journal of Biological Chemistry*. 279(11), 10822-10828, 2004.
- Liu, G.C.K. Ahrens, Jr, E.H. Screibman, P.H. and Crouse, J.R.. " Measurement of squalene in human tissues and plasma." *J Lipid Res* 17(1),38-45,1976.
- Mandal, A.K. Davis, J.B. and Bell, R.D.. "Myoglobinuria exacerbates ischemic renal damage in the dog." *Nephron*. 53,261-267,
- Manogue, K. R. Denvernter, J. H. V. and Cerami, A. : Tumor necrosis factor or cathetin. The cytokine handbook. Thomson. A. (Ed). *Academic press. Inc.*

Saniego. 1992.1989.

- Mohammad, A.N. and Adebayo, O.O.. "Contribution of renal oxygenases to glycerol-induced acute renal failure in the rat." *J Cardiovascular Pharmacol.* 39,834-841,2002.
- Moncada, S.. "The L-arginine: nitric oxide pathway." *Acta Physiol Scand* 145,201-227,1992.
- Nathan, C.. "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." *FASEB* 6,3051-3064,1992.
- Park, S.W. Yoon, H.J. Lee, H.B. Hooper, N.M. and Park, H.S.. " Nitric oxide inhibits the shedding of the glycosylphosphatidy-inositol-anchored dipeptidase from porcine renal proximal tubules." *J Biochem* 364,211-218, 2002.
- Rupprecht, H.D. Akagi, Y. Keil, A. and Hofer, G.. "Nitric oxide inhibits growth of glomerular mesangial cells: role of the transcription factor EGR-1." *Kidney Int* 57,70-82,2000.
- Sawaya, B.P. Koszewski, N.J. Quanle, Q.M. Langub, C. Monier, F.M.C. and Malluche, H.H.. "Secondary hyperparathyroidism and vitamin D receptor binding to vitamin D response elements in rats with incipient renal failure." *J Am Soc Nephrol.* 8,271-278,1997.
- Schmidt, H.H. and Murad, F.. "Purification and characterization of a human NO synthase." *Biochem Biophys Res Commun* 181,1372-1377,1991.
- Shulman, L.M. Yuhas, Y. Frolkis, I. Gavendo, S. and Eliahou, H.E " Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor -alpha." *Kidney Int.* 43(6),1397-1401,1993.
- Stavros, F. Evdokia, K. Eleni, D. Marcella, R. Renato, C.B. Anthony, T. and Pio, C.. " Generation of TNF- α , IFN-gamma, IL-6, IL-4 and IL-10 in mouse serum from trichinellosis: effects of the anti-inflammatory compound 4-deoxypyridoxine (4-DPD)." *Immunol Letters* 49,179-184,1996.
- Steven, M. and Vera, A.. "Anti-inflammatory cytokines." *Chest* 117,

1162-1172,2000.

Storm, H.M. Oh, S.Y. Kimler, B.F. and Norton, S.. "Radioprotection of mice by dietary squalene." *Lipid*. 28,555-559,1993.

Stuehr, D.J. and Nathan, C.F.. "Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells." *J Exp Med*. 169,1543-1555,1989.

Sung, J.H. Choi, D.H. Kim, D.H. Chun, B.G. and Choi, S.H.. " White ginseng saponin upregulated the production of TNF- α , IL-1 β , and NO in primary cultures of mixed glial cells." *J Ginseng Res*. 28,120-126,2004.

Synder, S. H. and Bredt, D. S., "Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*. 266,28-35,1992.

Tekin, A. Ilkser, A. Hamit, O. Saban, S. and Bedri, K.. "Effect of vitamin E and pentoxifylline on glycerol-induced acute renal failure." *Nephron*. 84,243-247,2000.

Tilg, H. Trehu, E. and Atkins, M.B.. "Interleukin-6 as an anti-inflammatory cytokines: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55." *Blood* 83,113-118,1994.

Valdivielso. J.M. Lopez, N.J.M. Eleno, N. and Perez, F.B.. "Role of glomerular nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure." *Can J Physiol Pharmacol*. 78,476-482,2000.

Van, S.. "Interleukin-6: an overview." *Annu Rev Immunol* 8,253-278,1990.

Venkatachalam, M.A. Rennke, H.G. and Sandstrom, D.J.. "The vascular basis for acute renal failure in the rat: preglomerular and postglomerular vasoconstriction." *Circ Res*. 38,267-279,1976.

Vexler, V.S. Robert, T.P.L. and Rosenau, W.. "Early detection of acute tubular injury with diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a rat model of myohemoglobinuric acute renal failure."

- Renal Failure*. 18,41-57,1996.
- Vicek, J. and Lee, T.H.. "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions." *J Biol Chem* 266, 7313-7316,1991.
- Yamawaki, M. Azuma, I. Saiki, I. Uemiya, M. Aoki, O. Ennyu, K. and Yamamura, Y.. "Antitumor activity of squalene-treated cell wall skeleton of *Nocardia rubra* in mice." *Gann*. 69,619-629,1978.
- Yee, S.T. Jeong, Y.R. Ha, M.H. Kim, S.H. Byun, M.W. and Jo, S.K.. "Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages." *Kor J Soc Food Sci Nutr*. 29,342-348.2000.
- Yolanda, A. Manuel, E. D. Francisco, A. Pradaa, J. Adela, Quesada. and Valentina, R.G.. "The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina." *Experimental Eye Res*. 80,535- 543,2005.
- Yumiko, N. Yasuhide, T. Yukari, T. Tadashi, S. and Mitsuru, U.. "Effect of dietary squalene on the fecal excretion and the lipid levels of serum and the liver in the rat." *Nutrition Res*. 17(2),243-257,1997.
- Zhao, H.H. Teruo, M. Atsuko, O. Ryoko, Y. Junya, N. and Mikihisu, T.. "Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure." *Euro J Pharmacol*. 406(3),453-460,2000.
- Zurovsky, Y.. "Models of glycerol-induced acute renal failure." *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 4,213-228,1993.
- 陳千植, 姜聲度, 鄭鉉雨., "免疫細胞 및 腫瘍細胞에 미치는 丹蔘의 效" *Kor J Oriental Med Patholog*. 12(2),125-131,1998.

감사의 글

어느덧 직장생활을 하며 어렵게 시작했던 힘든 대학원 생활이 끝나가며 그동안 있었던 일들이 마치 오래된 시간속의 일처럼 느껴집니다. 바쁜 생활 속에서 그래도 순탄하게 잘 마무리 해냈다는 성취감과 한편으론 더 배우고자 하는 욕심과 설레이는 마음으로 시작한 공부였기에 제가 생각하고 계획했던 것처럼 잘해 왔었는가를 다시 생각해보며 부족했었던 부분은 아쉬움으로 남긴 채 제 자신을 되돌아보는 시간을 갖게 되었습니다. 학교와 직장을 병행하며 많은 어려움도 있었고 또한 그로인해 배우는 것도 많았던 시간이었다고 생각합니다. 그래서 대학원 생활은 앞으로 제가 살아가는데 있어서도 많은 도움과 영향을 줄거라 생각하며 한층 더 성숙된 사람으로 살아갈 수 있지 않을까 싶습니다.

저에게 대학원생활은 또 다른 세상을 접하게 해주었고 그 곳에서 힘들어 할 때마다 항상 저의 곁에서 칭찬과 격려의 말씀을 아끼지 않아 많은 힘이 되어주신 지도 교수님이신 김종세 교수님께 먼저 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 논문 심사료 수고해주시며 대학원 생활 내내 저에게 많은 관심과 가르침, 채찍질을 해주신 노영복 교수님과 최영복 교수님에게도 심심한 감사의 말씀을 올립니다.

무엇보다도 뒤에서 묵묵히 저에게 공부 할 수 있는 기회를 열어 주시고 아낌없는 배려와 저의 정신적인 버팀목이 되어주신 전대병원 의과대학 조기현 교수님과 김명규 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 9년 동안 옆에서 제일 절 챙겨주시고 아껴주신 이유현 선생님과 공부할 동안에 비운 자리를 별탈 없이 채워준 우리 신경 생리 검사실 식구들에게도 고맙다는 말을 전합니다.

동물생리학 실험실에 들어와 모르고 헤매는 저에게 많은 도움을 줘 힘이 된 은정이게 고맙다는 말을 전하며, 같이 아무것도 모르고 들어와 적응하느라 함께 고생하며 서로 의지가 되었던 나윤영 선생님과 대학원 생활에 힘이 되었던 노영복 교수님방의 송선영 선생님, 김영호 선생님, 정민주 선생님께도 감사의 글 남깁니다.

끝으로 사람은 죽을 때까지 배워야 하는 거라시며 저를 믿고 대학원 진학을 전폭적으로 지지해주시고 아낌없는 사랑과 지원을 해주신 어머니께 깊은 감사의 글을 올립니다. 또한 약한 영어실력 때문에 옆에서 많은 도움을 줬던 영어 선생님인 언니에게도 고맙다는 말 남깁니다.

이분들이 있어 저에게 큰 힘이 되었고 무사히 직장생활을 하면서 공부를 하는 게 가능했다고 생각합니다. 그분들은 평생의 저의 재산이라고 생각하며 앞으로도 이분들에게 부끄럽지 않게 발전하는 모습으로 살아가겠습니다.

다시 한번 진심으로 감사드린다는 말 전합니다.
행복하시길 기원합니다.

----- 기윤 드림 -----

저작물 이용 허락서

학 과	생물학과	학 번	20047048	과 정	석사
성 명	한글: 기 윤 한문: 奇 允 영문: Gi Yun				
주 소	광주광역시 북구 각화동 무등파크 3동 803호				
연락처	E-MAIL : tcd1004 @ hanmail.net				
논문제목	한글 : 생쥐신장에서 glycerol 유도 급성신부전에서 TNF- α , IL-6 분비에 관한 스쿠알렌의 효과				
	영문 : Effects on squalene about secretion of TNF- α & IL-6 by glycerol-induced acute-renal failure in mice kidney				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대()

2007년 2월 23일

저작자: 기 윤 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하