



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2009年 2月
博士學位論文

In vitro 와 *In vivo* 상에서 *Candida albicans*로 유도한 염증인자에 미치는 *Squalene*의 효과

朝鮮大學校 大學院

生物學科

李 俊 行

In vitro 와 *In vivo* 상에서 *Candida albicans*로 유도한 염증인자에 미치는 *Squalene*의 효과

The Effects of Squalene on inflammation factors induced by Candida albicans in vitro and in vivo studies

2009年 2月 25 日

朝鮮大學校 大學院

生物學科

李 俊 行

In vitro 와 *In vivo* 상에서 *Candida albicans*로 유도한 염증인자에 미치는 *Squalene*의 효과

指導教授 金 鍾 世

이 論文을 理學博士學位 申請 論文으로 提出함.

2008年 10月

朝鮮大學校 大學院

生物學科

李 俊 行

李俊行의 博士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 崔榮福 印

委員 朝鮮大學校 教授 金永坤 印

委員 朝鮮大學校 教授 金宗中 印

委員 朝鮮大學校 教授 金生坤 印

委員 朝鮮大學校 教授 金鍾世 印

2008年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	V
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	4
제1절 재료	4
1. 시약	4
2. 공시균주	4
3. 실험동물	5
제2절 방법	5
1. 세포배양	5
2. <i>In vitro</i>	5
3. <i>In vivo</i>	5
4. NO (Nitric oxide) 측정	6
5. MTT 측정(세포활성도 측정)	6
6. <i>C. albicans</i> -유도 Cytokines의 측정	6
7. 단백질 함량 측정	7
8. Caspase/ CPP32 activity 측정	7
9. 역전사증합효소 연쇄반응(RT-PCR)	7
10. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	8
11. Western blot analysis	9
12. 통계학적 분석	10
제3장 결과	11
제1절 HEK 293 cells에 대한 SQ 세포독성	11
제2절 <i>C. albicans</i> -유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현에 대한 SQ 효과	13
제3절 <i>C. albicans</i> -유도 NO 생산에 대한 SQ 효과	14
제4절 <i>C. albicans</i> -유도 TNF- α 생산에 대한 SQ 효과	18
제5절 <i>C. albicans</i> -유도 IL-6 생산에 대한 SQ 효과	22
제6절 <i>C. albicans</i> -유도 Caspase-3 생산에 대한 SQ 효과	26
제7절 <i>C. albicans</i> -유도 TNF- α , IL-6에 대한 SQ의 Western blot 결과	30

제8절 <i>C. albicans</i> -유도 NF- κ B발현에 대한 SQ 효과	31
제4장 고찰	32
제5장 결론	35
참고문헌	37

List of Tables

Table 1. Analysis of cell viability effects on SQ	11
Table 2. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of <i>C. albicans</i> from HEK 293 cells at 3 hour	14
Table 3. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of <i>C. albicans</i> from mice kidney	16
Table 4. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of <i>C. albicans</i> from HEK 293 cells at 12 hour	18
Table 5. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of <i>C. albicans</i> from mice kidney	20
Table 6. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of <i>C. albicans</i> from HEK 293 cells at 12 hour	22
Table 7. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of <i>C. albicans</i> from mice kidney	24
Table 8. Effects of SQ on the Caspase-3/CPP 32 activity in the presence of <i>C. albicans</i> from HEK 293 cells at 12 hour	26
Table 9. Effects of SQ on the Caspase-3/CPP 32 activity in the presence of <i>C. albicans</i> from mice kidney	28

List of Figures

Fig. 1. Analysis of cell viability effects on SQ	12
Fig. 2. The effect of SQ on IL-1 β , TNF- α , and IL-6 e×pression in HEK 293 cells	13
Fig. 3. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of <i>C. albicans</i> (3 \times 10 ⁶ /ml) from HEK 293 cells	15
Fig. 4. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of <i>C. albicans</i> (2 \times 10 ⁶ /kg) from mice kidney. <i>C. albicans</i> and SQ injected intraperitoneal injection	17
Fig. 5. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of <i>C. albicans</i> (3 \times 10 ⁶ /ml) from HEK 293 cells	19
Fig. 6. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of <i>C. albicans</i> (2 \times 10 ⁶ /kg) from mice kidney.	21
Fig. 7. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of <i>C. albicans</i> (3 \times 10 ⁶ /ml) from HEK 293 cells	23
Fig. 8. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of <i>C. albicans</i> (2 \times 10 ⁶ /kg) from mice kidney.	25
Fig. 9. Effects of SQ on the Caspase-3/CPP 32 activity in the presence of <i>C. albicans</i> (3 \times 10 ⁶ /ml) from HEK 293 cells	27
Fig. 10. Effects of SQ on the Caspase-3/CPP 32 activity in the presence of <i>C. albicans</i> (2 \times 10 ⁶ /kg) from mice kidney	29
Fig. 11. Effect of SQ on lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-6 expression in HEK 293 cells at 12 hour	30
Fig. 12. Effect of SQ on lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in HEK 293 cells	31

ABSTRACT

The Effects of Squalene on inflammation factors induced by *Candida albicans* *In vitro* and *In vivo* studies

Lee Jun Haeng

Advisor : Prof. Kim Jong-Se Ph.D.

Department of Biology,

Graduate School of Chosun University

The purpose of this study was to evaluate the effects of SQ on the *C. albicans*-induced the interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO), Caspase-3, and nuclear factor kappa B (NF- κ B) in human embryonic kidney cells (HEK 293 cells) and mice kidney.

The purity of SQ was approximately 99% *in vitro* and *in vivo* experiments, each groups were treated with SQ solutions or not. They were contaminated *C. albicans*. The production levels of TNF- α , IL-6 and Caspase-3/ CPP 32 activity in culture medium or tissue solutions were quantified using ELISA kit. The expression of mRNA IL-1 β , TNF- α and IL-6 was carried out by RT-PCR. The expression of NF- κ B was carried out by EMSA method.

In vitro experiments, the cytotoxic effects of SQ were evaluated by the MTT analysis. Investigation has been made on both the expression of mRNA, IL-1 β , TNF- α , IL-6, NF- κ B and production of NO, TNF- α and IL-6, Caspase-3 activity in human embryonic kidney cells (1×10^5 cells/well) after treatment *C. albicans* (3×10^6 cells/ well) or SQ.

The groups were divided as follows: Group 1: Control, Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only, Group 3: pre treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), Group 4: pre treated with the SQ

(0.1%/ml) for 30 min and were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), Group 5: pre treated with SQ (0.05%/ml) and were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), Group 6: pre treated with SQ (0.1%/ml) and were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml).

In vivo experiments, it was investigated to production of NO, TNF- α , IL-6 and Caspase-3 activity after treatment *C. albicans* (2×10^6 cells/kg) or SQ (80ml/kg). The groups were divided as follows: Group 1: Control, Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only, Group 3: pre treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg), Group 4: pre treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg), Group 5: pre treated with SQ (80ml/kg) and were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg).

The SQ was not observed the cytotoxicity by MTT analysis. The expression of mRNA IL-1 β , TNF- α and IL-6 were highly increased by *C. albicans*. however, SQ was decreased the expression of mRNA IL-1 β , TNF- α and IL-6. The production of NO, TNF- α , IL-6 and Caspase-3 were increased by *C. albicans*. SQ significantly decreased the production of *C. albicans*-induction by dependent on time and concentrations manners ($p < 0.05$). The expression of NF- κ B was decreased by treatment of SQ. *In vivo* experiments, results ($p < 0.05$) were observed to be similar with *in vitro* experiments.

Finally, it was found that the SQ may increase the immune response on the *C. albicans* induced-renal damage.

제1장 서론

Candida albicans(이하, *C. albicans*)는 정상인의 경우 소화기관이나 질 점막 및 피부 등에서 나타나는 가장 흔한 병원성균주로 인체의 정상 세균총으로 *Candida* 속 중 가장 독성이 강한 균종으로 알려져 왔으며, 면역억제제 복용, 스테로이드나 항생제 남용, 비타민 결핍증, 만성소모성질병, 후천성면역결핍 증후군환자들에서 자주 발견이 된다(Yoo & Suh, 1974; Kwon, 1994; Kim *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2004; Kim, 2006).

칸디다증(candidiasis)은 피부, 점막, 신장 등에서 급성 혹은 만성으로 발병하며, 사망률이 약 30%정도이며, 칸디다 감염 시 의학적 처치 방법은 화학치료제(amphotericin B, azole drug)를 이용하지만, 독성과 약품 내성이 문제 시 되어 왔다(Deva *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2004; Lee and Han, 2006). *C. albicans*를 포함한 급성 염증반응의 경우 흡입, 발열, 반점, 통증, 기능 상실 등이 유발 되는 데, 이는 조직 내 백혈구와 혈장 내로 침윤되기 때문이다(Debjani *et al.* 2008). 또한, *C. albicans*는 사람과 동물의 급성 및 만성전신 감염 중에서 가장 흔히 발견되며, 생체의 생리기능상 신장감염이 용이하여 신장 칸디다증을 유발하고, 특히 신장 이식한 경우에는 심각한 합병증과 함께 사망을 유발시키는 요인으로도 많이 알려져 왔다(Kwon, 1994; Yoo *et al.*, 1995; Nampoory *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2001; Karłowicz, 2002; Espada *et al.*, 2003; Veroux *et al.*, 2006; Han, 2007; Baradkar *et al.*, 2008; Mohaya *et al.*, 2008).

Nitric oxide (NO)는 NO synthase (NOS)라는 효소에 의해 합성이 이루어지는데, 산소와 NADPH 존재 하에서 L-arginine이 L-citrulline과 NO로 전환되면서 생성되어지는 물질이다. NO는 크게 세 가지 효소로 나누어지는데, neural (nNOS), endothelia (eNOS)와 cytokine 혹은 inflammation 반응, 혹은 외부 자극(lipopolysaccharide, 혹은 interferon-gamma)등에 의해 유도 되어 지는 inducible NOS (iNOS) 등이 있다. 그 중에서 iNOS가 염증 반응에 관여한다. nNOS와 eNOS는 항상 발현되어 있으며, iNOS의 경우 Interferon-gamma, lipopolysaccharide (LPS), 그리고 여러 가지 염증성 cytokines (IL-1 β , TNF- α)의 자극이 있을 때 발현된다. 보통 eNOS는 강력한 혈관확장제로서 혈관의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다(Dennis and Michael, 1985; Stuehr *et al.*, 1989; Arany *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Byun *et al.*, 2005; Leon *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2008). NO는 단기간 존재하는 안정성 프리라디칼로서 중요한 생

리 기능을 담당하며 많은 세포에서 만들어지는데, chronic bacterial, viral infection, parasitic infection 등에 의해 세포에서 NO 수치가 지속적으로 상승되어 있는 경우 유전독성의 원인이 되기도 하며, NOS는 인간 암에서도 생성된다(Rui *et al.*, 1995; Wink *et al.*, 2008).

Cytokine은 lymphokine으로 인체의 macrophage, lymphocyte, neutrophil, fibroblast cells, vascular endothelial cells 등의 다양한 세포 내에서 분비되어 신체내의 염증 작용, 조혈 작용 및 대사에 관여하는 물질로, interleukin (IL), epidermal growth factor (EGF), cytotoxic factor, activating or inhibitory factor, colony stimulating factor, tumor necrosis factor (TNF- α), interferon (IFN), erythropoietin, platelet derived growth factor (PDGF) 등의 다양한 종류가 알려져 있다(Kim *et al.*, 1999; Suh *et al.*, 1999; Hirano, 2002). 세균이나 다른 요인에 의해 감염이 일어난 경우 국소에서 염증성 chemokine이 생성되어 단핵구나 호중구가 다수 보충 된다. 이들 세포는 세균 등의 탐식을 하는 한편, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 등의 cytokine을 생산하는데, IL-1, TNF- α , IL-6 등은 중추신경계에 작용하여 발열을 유도하는 한편, 간세포에 작용하여 급성기 단백질의 생산을 유도하고, B세포와 T세포의 증식 분화를 유도한다(Hirano, 2002; Straub *et al.*, 2005). TNF- α 는 활성화된 대식세포에서 생성 되는 데, 세균감염이나 악성 종양 발생 시 중요한 역할을 하며, 보통 IL-1 β 와 함께 작용하며 감염이나 종양이 있을 때 나타나는 면역반응에서 inflammatory cytokine으로 작용한다. 또한, 다른 cytokine이나 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성을 유도하며, 섬유아세포의 활성화와 증식, 파골세포의 활성화에 의한 골 흡수 등에도 관여한다(Hirano, 2002; Li *et al.*, 2006). IL-6 는 주로 활막 섬유아세포, 대식세포, T세포에서 생산된다. 국소적으로는 섬유아세포의 증식, B세포의 성장 및 분화에 관여하고, 간에서 hepatocyte-stimulating factor와 같은 murine B cells hybridomas의 성장촉진, multi-colony stimulating factor에 작용해서 hematopoietic stem cells를 활성화 시키며, T세포의 증식과 분화에 관여한다. 또한, 감염, 염증과 손상 조직에 대해 acute phase protein의 합성, 조혈 기능 등의 역할을 수행함으로써 숙주세포 방어 기전에 중요한 역할을 한다(Frydas *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1999; Hirano, 2002).

Squalene (SQ)는 triterpene으로 6개의 isoprene을 가지며, β -carotene과 구조적으로 유사하고, cholesterol 합성에 관여하는 중간 대사산물로서 60~85%가 dietary SQ 형태로 흡수 된다. SQ는 olive oil에 0.2~0.7%가 함유되어 있고, human dietary fat와 oil에

는 0.002~0.03%가 함유 되어져 있다.

SQ는 olive oil, palm oil, wheat-germ oil, amaranth oil, rice bran oil등 매우 광범위한 형태로 분포하며, 인체 지방에서의 대사 연구를 통해 80%가 central neutral lipid droplet, 20%는 microsomal membrane 결합 형태로 함유되어져 있다(Chinthalapally *et al.*, 1998; Gregory, 1999; Smith, 2000). 구강을 통해 SQ를 흡수하게 되면 plant sterol의 hepatic & serum level이 감소되어지고(Strandberg *et al.*, 1989), 9주간 rapeseed oil에 SQ (1g/day)를 첨가하여 공급해 주면, serum total (VLDL, LDL-cholesterol)이 증가하지만, SQ (0.5g/day)를 6주간 공급하면 정상이고(Tatu & Hannu, 1994), SQ(900 mg/day)를 7-30일간 공급하면 serum SQ level이 17배 증가하나 serum triglyceride와 cholesterol 성분은 변함이 없고, 60%가 fecal excretion 된다(Strandberg *et al.*, 1989).

SQ는 고효율 활성산소 분해제(Saint-Leger *et al.*, 1986), 암에 대한 화학적 방어효과(Chinthalapally *et al.*, 1998; Smith, 2000), 그리고 항 종양효과(Yamaguchi *et al.*, 1985; Nakagawa *et al.*, 1985; Harold, 1997)가 있음이 알려져 왔다.

본 연구에서는 *Candida* 속 진균 중에서도 피부, 구강 및 질 점막에 기생하고 있다가 숙주 동물의 저항력을 약화시키는 병원성이 강하고 가장 빈번히 동물에 질병을 유발시키는 *C. albicans*-유도 염증 반응에 대해 인체 신장 세포주를 이용한 *in vitro*와 생쥐를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 *C. albicans*에 의해 유도되어지는 염증 반응 억제에 대한 SQ의 처치로 염증 반응 경감 효과를 관찰하였다.

제2장 재료 및 방법

제1절 재료

1. 시약

본 실험에 사용한 시약은 Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, USA), SQ는 (주)세모(순도 99%이상), Sodium nitrate (Sigma, USA), sulfanilamide (Sigma, USA), N-(naphthyethylene)diamine (Sigma, USA), Tris (Bio Basic, USA), Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma, USA), Sodium chloride (NaCl, Junsei, Japan), Triton-X 100 (Junsei, Japan), Sodium nitrate (Sigma, USA), TNF- α , IL-6, IL-1 β , β -actin oligomer 및 RT-PCR premix, PCR premix는 Bioneer (대전, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

TNF- α , IL-6에 대한 단클론항체 (monoclonal antibody)의 ELISA Kits(R&D systems, MIN, USA), RT-PCR premix, PCR premix(Bioneer, Korea), 32 P (Promega, USA), Caspase-3/CPP32 Colorimetric Assay Kit(Biovision, USA), DMEM, penicillin/streptomycin, FBS, PBS (GIBCO, USA), culture plate (6 well, 24 well, Corning, USA), culture dish (100 π , SPL, Korea)를 사용하였다.

2. 공시균주

C. albicans NIH A-207은 전남대학교 생화학교실(광주, 한국)로부터 공급받아 Sabouraud dextrose broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD)에서 교반을 하면서 28°C에서 배양하였다. 24시간 동안 배양 후 세포들은 2,000 \times g에서 원심 분리하여 수확하였고, PBS로 3회 세척하였으며, 필요한 농도(1×10^5 /ml)로 희석하여 사용하였다.

3. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 다물 실험동물센터 (대전, 한국)에서 생산, 공급하고 있는 ICR계 생쥐 (체중 25-35 g)를 사용하였다. 생쥐는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $45\pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장 ($40\times 25\times 17\text{cm}$)에서 사육하였으며, 사료 (제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취 하도록 하였다.

제2절 방법

1. 세포배양

세포배양은 Human embryonic kidney cells line (HEK 293 cells)은 DMEM에 10% fetal bovine serum (FBS), $100\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

2. *In vitro*

HEK 293 cells은 culture dish ($1\times 10^5/\text{ml}$)에서 세포 배양조건에 의해 배양하였다. 각각의 실험군에 다음과 같은 조건으로 HEK 293 cells에 *C. albicans*와 SQ를 처치하였다. 실험군 1은 대조군, 실험군 2는 *C. albicans* ($3\times 10^6/\text{ml}$)만 처치한 군, 실험군 3은 SQ (0.05%/ml)를 30분전에 세포배양액에 처치하고 *C. albicans*를 처치한 군, 실험군 4는 SQ (0.1%/ml)를 30분전에 세포배양액에 처치하고 *C. albicans*를 처치한 군, 실험군 5는 *C. albicans*를 처치한 후 SQ (0.05%/ml)를 처치한 군, 실험군 6은 *C. albicans*를 처치한 후 SQ (0.1%/ml)를 각각 처치하였다.

3. *In vivo*

SQ ($80\text{ml}/\text{kg}$)와 *C. albicans* ($2\times 10^6/\text{kg}$)는 ICR계 생쥐의 복강에 주입하였다. 실험군

는 실험군 1은 대조군, 실험군 2는 *C. albicans*만 투여한 군(1, 3일째), 실험군 3은 SQ (80ml/kg)를 7일간 복강투여(1일 1회)한 후, *C. albicans*를 투여한 군(1일, 3일째), 실험군 4는 SQ (80ml/kg)를 3일간 복강투여(1일 1회)한 후, *C. albicans*를 투여한 군(1일, 3일째), 실험군 5는 *C. albicans*를 투여한 후 SQ (80ml/kg)를 투여한 군(1일, 3일째)으로 각 실험군별, 생쥐 7마리를 사용하였다.

4. NO(Nitric oxide)측정

신장 조직 혹은 세포배양액에서 생성된 NO의 양은 NO_2^- 의 형태로써 Griess시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plates에 각 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, 540nm파장에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. 이 때 Sodium nitrate (0.5~100M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

5. MTT 측정(세포활성도 측정)

MTT assay 방법은 다음과 같다. 배양중인 cells 950 μ l에 MTT solution을 50 μ l씩 섞어서 세포에 처리해 준 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 3~4시간 incubation 하고, media를 모두 제거 하였다. DMSO (350 μ l)를 각각의 sample에 넣어 반응시킨 후, microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정 하였다. 이때, blank는 PBS 용액으로 하였다.

6. *C. albicans*-유도 Cytokines의 측정

TNF- α , IL-6 등의 cytokine의 측정 방법은 Bioneer회사의 메뉴얼에 따랐다. 50 μ l 분석 희석액(assay diluent)을 제공된 well에 각각 넣고, 각 사이토카인에 대한 표준용액과 실험액을 각각 50 μ l씩 well의 중심부에 첨가하여 잘 섞이도록 plate를 가볍게 바닥에 흔든 다음 제공된 밀폐용 테이프로 덮어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 밀폐용 테이프를 제거하고 제공된 washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 측정하고자 하는 cytokine의 conjugate용액 100 μ l를 각 well에 넣고 밀폐용 테이프로 덮어 2

시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 100 μ l 기질용액을 각 well에 넣고 30분 동안 실온에서 차광상태로 보관하면서 반응시켰다. 그 후, 정지 용액을 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 이내에 세포배양액에 분비되어 kit내 반응시약과 반응한 TNF- α , IL-6 분비량을 각각 측정하였다(microplate reader:450nm, wavelength correction:570nm, USA).

7. 단백질 함량 측정

단백질 농도는 Bicinchoninic acid protein assay kit (이하, BCA, USA)를 이용하여 분석하였다. BCA를 표준물질로 사용하여 각각의 단백 시료 25 μ l를 96well 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 540nm에서 O.D.(흡광도)를 측정하였다.

8. Caspase/CPP32 activity 측정

준비된 신장 조직, 혹은 세포용해 용액을 각각 100 μ g씩 세포용해 완충액 100 μ l에 넣고 조직을 용해 한 후, 10분간 ice에서 incubation 했다. 10,000 \times g에서 1분간 원심분리 한 후 상층액을 새로운 튜브로 옮기고 나서 ice에 보관하였다. 단백질량은 100~200 μ g의 단백질이 50 μ l의 세포분해완충액에 존재하도록 희석하여 준비된 96well plates에 옮긴다. 2 \times Reaction buffer(반응시약, 10mM DTT함유) 50 μ l를 각 튜브에 넣는다. 4mM LEHD- ρ NA substrate 5 μ l를 넣고 37°C에서 1-2시간 incubation 하였다. 그 후, 신장조직 및 세포용해 용액에 있는 caspase-생성량을 microplate reader에서 측정하였다(micro reader:405nm, USA).

9. 역전사중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

각 실험군별 세포를 배양한 후, RNA는 TRIzol 방법을 이용해서 추출하였다. 먼저 각각의 배양된 세포용액을 제거 한 후, 남아 있는 세포에 Trizol 1ml씩 넣고, 5분간 실온에 방치하였다. Chloroform 200 μ l씩 각 tube에 넣고 혼합한 후, 2~3분간 실온에 방

치한 후, 15,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 그 후, 새로운 tube에 단백질을, 탄수화물이 섞인 백색 띠의 윗부분 mRNA를 조심스럽게 취해 다른 tube로 옮겼다. Isopropanol (1x)을 각 tube에 동량(equal volume)을 넣은 후, inverting 시키고, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 그 후, 상층액 제거 후, 70% ethanol로 2회 washing 하였고, ethanol을 완전히 제거한 다음, 30~500 μ l DEPC 용액을 첨가(사용하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관)하여 각 실험에 사용하였다. Total mRNA는 다음과 같이 정량하였다. mRAN 용액 2 μ l를 DEPC 용액 98 μ l에 넣고 ELISA reader (micro reader: 260/280nm, U.S.A.)를 통해 O.D.값을 측정하였다. Total mRNA를 정량한 값을 이용하여 RT를 위해서 cDNA (50 $^{\circ}$ C 60min, 95 $^{\circ}$ C 5min, Bioneer RT premix)를 합성하였다. cDNA를 합성한 후 PCR를 수행하였다(GeneAmp, PCR system 2700, Applied Biosystems, USA).

PCR 조건은 다음과 같다. IL-1 β : 94 $^{\circ}$ C 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C 60초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 30초 extension, 35cycle, TNF- α , IL-6: 94 $^{\circ}$ C 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C 60초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 30초 extension, 40cycle, β -actin: 94 $^{\circ}$ C 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 30초 extension, 25cycle을 반복하였다. 실험에 사용한 각 primer의 sequence (Yoon *et al.*, 2007, PubMed site(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)제공)는 Bioneer사에 의뢰하여 사용하였다. TNF- α 는 sense:5'CCC AAA TGG CCT CCC TCT C3', antisense:5'CAA ATC GGC TGA CGG TGT GTC C3', IL-6는 sense: 5'ATG AAG TTC CTC TGC AAG AGA CT 3' , antisense: 5'CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC3', IL-1 β 는 sense: CTG AAG CAG CTA TGG CAA CT, antisense: ACA GGA CAG GTA TAG ATT C, β -actin는 sense: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C, antisense: TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G 를 조작해서 사용했다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel을 이용하여 분석하였으며, Ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다.

10. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

EMSA는 Kim (Kim *et al.*, 2008)의 방법을 이용하여 실험 조건에 맞게 실시하였다. 세포를 PBS로 씻은 후 2ml의 lysis buffer A (10m MHEPES (pH 7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 30 μ g/ml eupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 1mM benz amidine, 5 μ g/ml pepstatin, 0.5mM PMSF)에 넣고 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 후, 12.5 μ l

의 10% Nonidet P-40을 첨가하였다. 10초간 강력히 vortex하여 세포막을 파괴하였고, 30초간 균질화 시켰다. nuclearpellet에 50 μ l의 coldnuclear extraction buffer C (20mM HEPES (pH 7.9), 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 2 μ l/ml leupeptin, 2 μ l/ml aprotinin, 1mM benz amidine, 5 μ l/ml pepstatin, 1mM PMSF)를 넣고 ice에서 40분간 반응시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 13,000g에서 원심분리한 후, supernatant (nucleus) protein 농도를 BCA법을 이용하여 측정하였다. 측정된 시료를 2 μ g/ml로 하여 각각의 protein, 3dr D.W. 10 \times GRAB 50(2 μ l), 20mM DTT (1 μ l), Poly (dI, dC) (1 μ l), 32 P end labeled 45-mer double strand NF- κ B oligonucleotide (Promega, USA)와 각각 혼합한 후, 30분간 상온에서 반응시켰다. Gel을 0.5 \times TBE buffer를 넣고 200V, 20min간 pre-run 시켰다. 그 후, DNA-protein 혼합물을 polyacrylamide gel에서 loading buffer (50mM Tris, 200mM glycine pH 8.5, 1mM EDTA)를 이용하여 200V, 70min에서 전기영동 하였다. 전기영동 후, gel을 말린 후 암실에서 왓만 paper 위에 X-ray film 2장을 카세트 위에 올려 놓고, -80 $^{\circ}$ C에 o/n 시킨 후, 감광하였다.

11. Western blot analysis

Western blot 분석은 Kim(Kim et al., 2008)의 방법을 이용하여 실험 조건에 맞게 실시하였다. Sample들을 10mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail이 혼합된 완충용액에서 일정하게 균질화 시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm, 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 실험에 이용하였으며, 단백질의 측정은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다. 동량의 단백(20 μ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE)겔로 전기영동 시키고, PVDF membrane에 전이 시킨 다음, 막을 5% 탈지유에 반응시켜 blocking 과정을 거친 후에 1차 항체인 anti-TNF- α , anti-IL-6 antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 각각 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다. 그 후, 2차 항체를 1~2시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. ECL kits (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)로 반응시킨 후, Luminescent image analysis (LAS-4000 mini, Fujifilm, Japan)장치를 이용하여 밴드를 확인하였다.

12. 통계학적 분석

각 실험군별 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터 통계프로그램인 Statistcal Analsis System (SAS)를 이용한 ANOVA test에 의하여 검정하였으며, 각 p값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

제3장 결과

제1절 HEK 293 cells에 대한 SQ 세포독성

본 실험에 사용한 SQ가 HEK 293 cells에 세포 독성을 보이는 지 여부를 알아보기 위하여 MTT assay 실험 방법을 통해 세포독성 여부를 측정하였다. 실험한 결과 실험에 사용한 SQ 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.5%/ml)에서는 관찰 6, 12, 24 시간에 SQ를 처리하지 않은 대조군에 비해 세포독성이 별 차이가 없음을 관찰하였다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Analysis of cell viability effects of SQ

	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>
6h	100±1.1	99.5±1.8	98.6±1.8	97.6±2.9	96.3±1.0
12h	100±1.4	98.7±1.0	98.0±1.9	95.4±2.1	90.5±1.2
24h	100±1.2	98.7±1.1	98.1±2.4	94.1±1.7	81.6±2.1

The cells viability effects were analyzed with the MTT assay in cultured HEK 293 cells.

Group 1: Control

Group 2: SQ (0.01%/ml)

Group 3: SQ (0.05%/ml)

Group 4: SQ (0.1%/ml)

Group 5: SQ (0.5%/ml)

Each groups were cultured during the 6, 12, and 24 hours. After incubation, each medium was placed on to the 96 well plates and measured in ELISA reader at 540 nm.

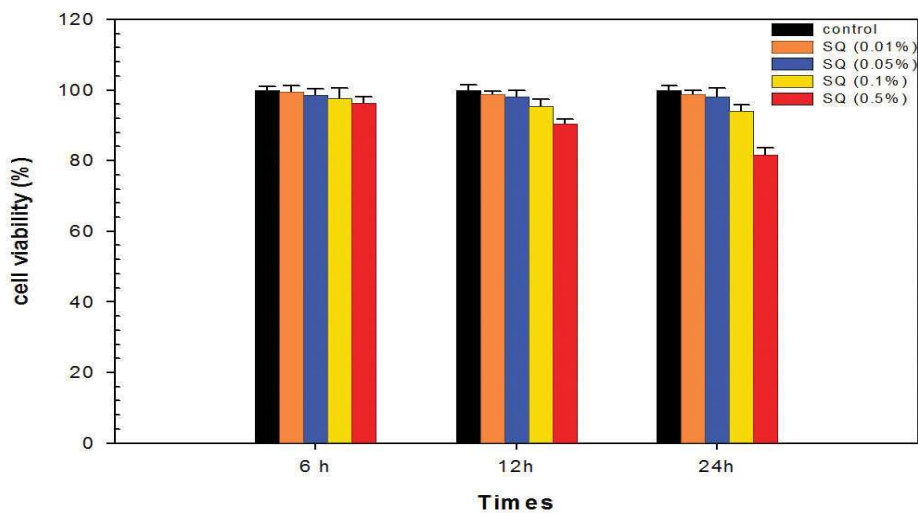


Fig.1. Analysis of cell viability effects of SQ.

The cells viability effects were analyzed with the MTT assay in cultured HEK 293 cells (1×10^5 cell/well). Each groups were cultured during the 6, 12, and 24 hours. After incubation, each medium was placed on to the 96 well plates and measured in ELISA reader at 540 nm. The results are expressed as the mean \pm SD in the triplicate experiment.

제2절 *C. albicans*-유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현에 대한 SQ 효과

HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*-유도 염증반응 인자들에 대해 RT-PCR를 사용하여 SQ의 효과를 관찰하였다. 염증반응 인자 중 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현량이 *C. albicans* 처치 후에 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. SQ (0.05, 0.1%/ml)를 처치한 경우 *C. albicans*-유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 SQ (0.01%/ml)는 *C. albicans*-유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현량에 별 효과가 없음을 관찰할 수 있었다.

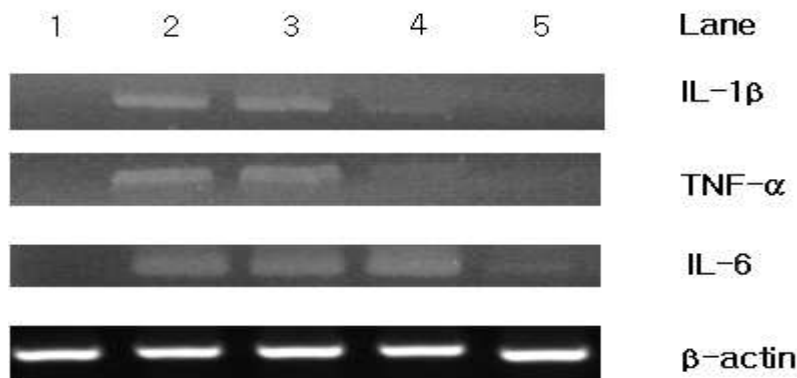


Fig.2. The effect of SQ on IL-1 β , TNF- α , and IL-6 expression in HEK 293 cells. The cells were treated with the SQ for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) for 6 hours. Total mRNA were extracted from the cells. Induction of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 mRNA were measured by reverse transcriptase polymerase reaction (RT-PCR). β -actin was used as the control.

Lane 1: Control

Lane 2: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$, 6 hours) only

Lane 3: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) + SQ (0.01%/ml)

Lane 4: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) + SQ (0.05%/ml)

Lane 5: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) + SQ (0.1%/ml)

제3절 *C. albicans*-유도 NO 생산에 대한 SQ 효과

HEK 293cells에 대한 *C. albicans*-유도염증반응 인자들 중 NO 생산량에 미치는 SQ 효과를 관찰하였다. *C. albicans*를 처치한 군의 경우 NO 생산량을 대조군에 비해 급격하게 증가시키는 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 SQ를 처치한 군중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 NO 생산량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$) (Table 2, Fig. 3).

Table 2. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of *C. albicans* from HEK 293 cells at 3 hour.(unit: uM/mg protein)

<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>	<i>Group 6</i>
0.97±0.02	2.76±0.17	2.31±0.25	1.74±0.11*	2.41±0.18	2.42±0.12

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was immediately treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was immediately treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, * $p < 0.05$).

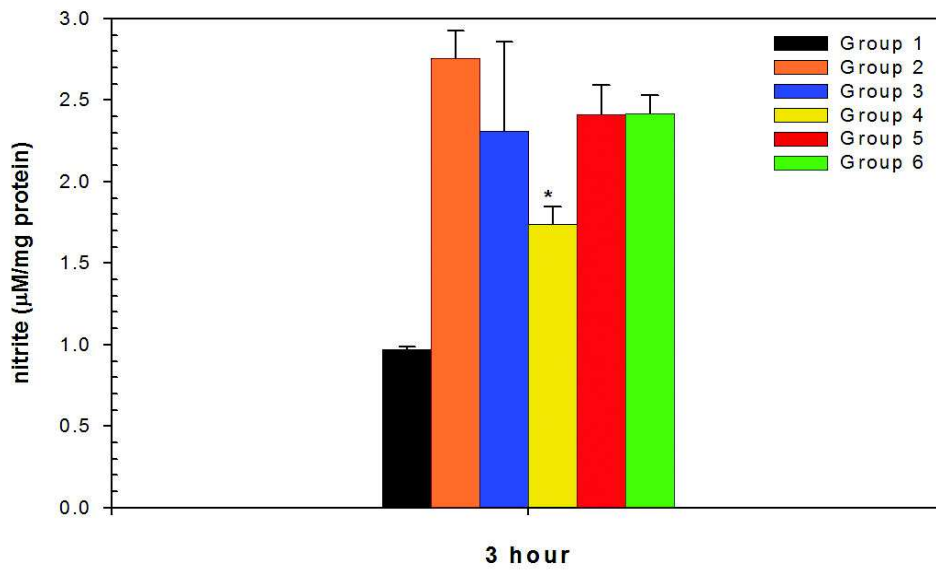


Fig.3. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) from HEK 293 cells.

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 5: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.05%/ml) was treated

Group 6: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.1%/ml) was treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD,

*p<0.05).

생쥐에 *C. albicans*를 감염(복강투여, 2×10^6 /kg)시킨 후, NO 생성량을 신장 조직을 통해 1일, 3일째 경과 후 관찰하였다. SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염시킨 군에서 1, 3일째 모두 신장 조직 내에서의 NO 생산량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Table 3, Fig. 4). 그러나 선처치 기간이 짧은 3일군과 *C. albicans* 처치 후에 SQ를 처치한 군에서는 *C. albicans*-유도 NO 생성량이 감소되지 않음을 관찰할 수 있었다.

Table 3. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of *C. albicans* from mice kidney. (unit: uM/mg proteins)

	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>
1 day	1.27±0.07	5.53±0.35	1.70±0.07*	2.26±0.33*	4.72±0.89
3 day	1.25±0.09	4.22±0.60	1.88±0.48*	2.51±0.09*	4.18±0.44

C. albicans and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, * $p < 0.05$).

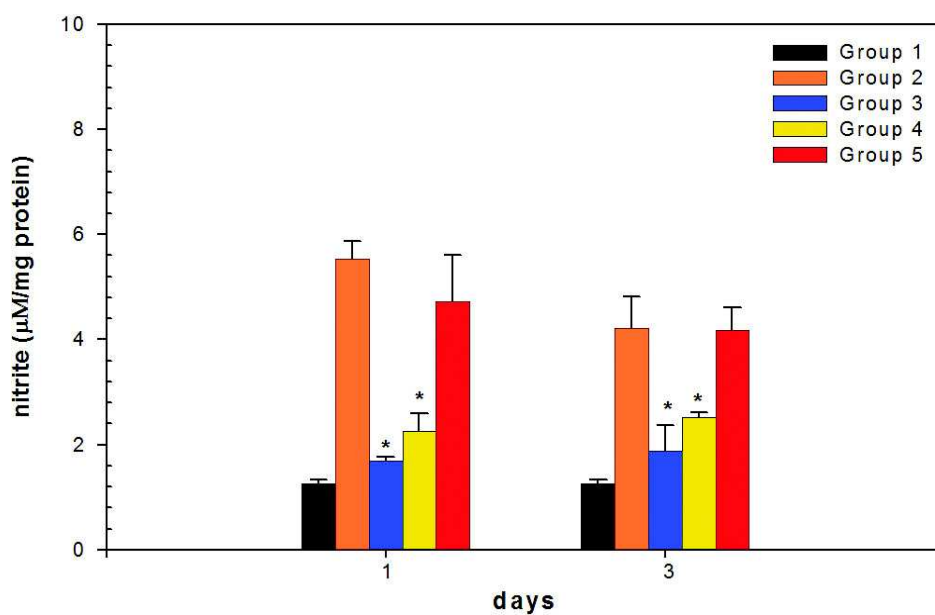


Fig.4. Effects of SQ on the nitric oxide (NO) production in the presence of *C. albicans* (2×10^6 /kg) from mice kidney. *C. albicans* and SQ were injected by intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) later injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed for 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, *p<0.05).

제4절 *C. albicans*-유도 TNF- α 생산에 대한 SQ 효과

HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*-유도 염증반응 인자들 중 TNF- α 생성량에 미치는 SQ 효과를 관찰하였다. *C. albicans*를 HEK cells에 처치하면 TNF- α 생성량이 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. SQ를 처치한 군중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 TNF- α 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Table 4, Fig. 5).

Table 4. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of *C. albicans* from HEK 293 cells at 12 hour. (unit: pg/ml protein)

<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>	<i>Group 6</i>
876.0 \pm 29.6	1072.9 \pm 21.79	925.2 \pm 12.56	544.1 \pm 5.02*	916.9 \pm 6.08	934.6 \pm 13.8

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was immediately treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was immediately treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, * $p < 0.05$).

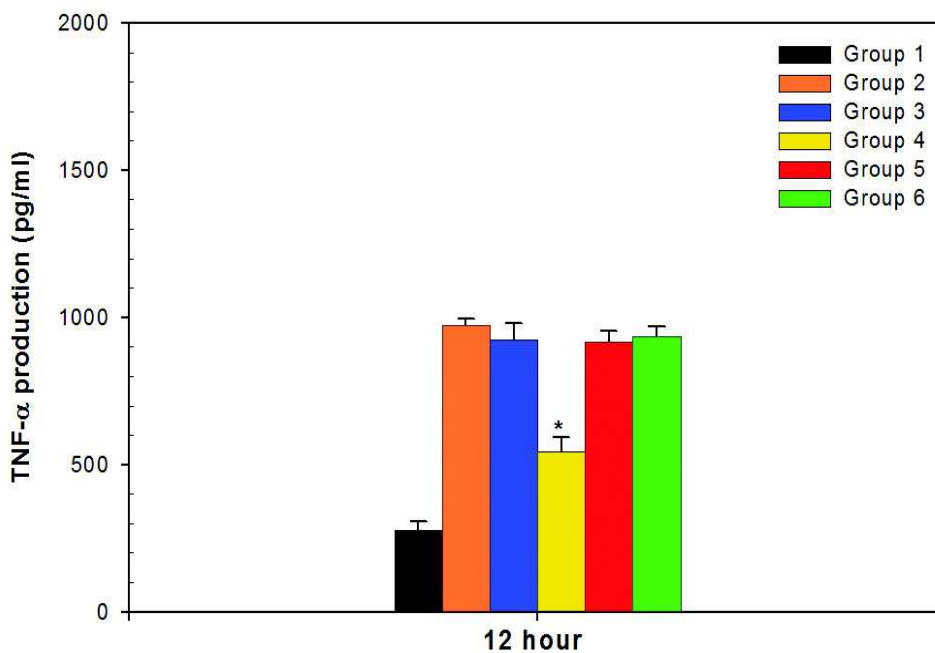


Fig.5. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of *C. albicans* (3×10^6 /ml) from HEK 293 cells.

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, *p<0.05).

생쥐에 *C. albicans*를 감염(복강투여, 2×10^6 /kg)시킨 후, TNF- α 생성량을 신장조직을 통해 감염 후 1일, 3일 경과 후 관찰하였다. SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염시킨 군에서 3일째 군에서만 신장 조직 내에서의 TNF- α 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Table 5, Fig. 6).

Table 5. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of *C. albicans* from mice kidney.(unit: ng/ml proteins)

	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>
1 day	0.14 \pm 0.04	0.72 \pm 0.17	0.58 \pm 0.13	0.98 \pm 0.11	0.94 \pm 0.06
3 day	0.14 \pm 0.04	1.01 \pm 0.20	0.60 \pm 0.13*	0.91 \pm 0.10	0.91 \pm 0.07

C. albicans and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, * $p < 0.05$).

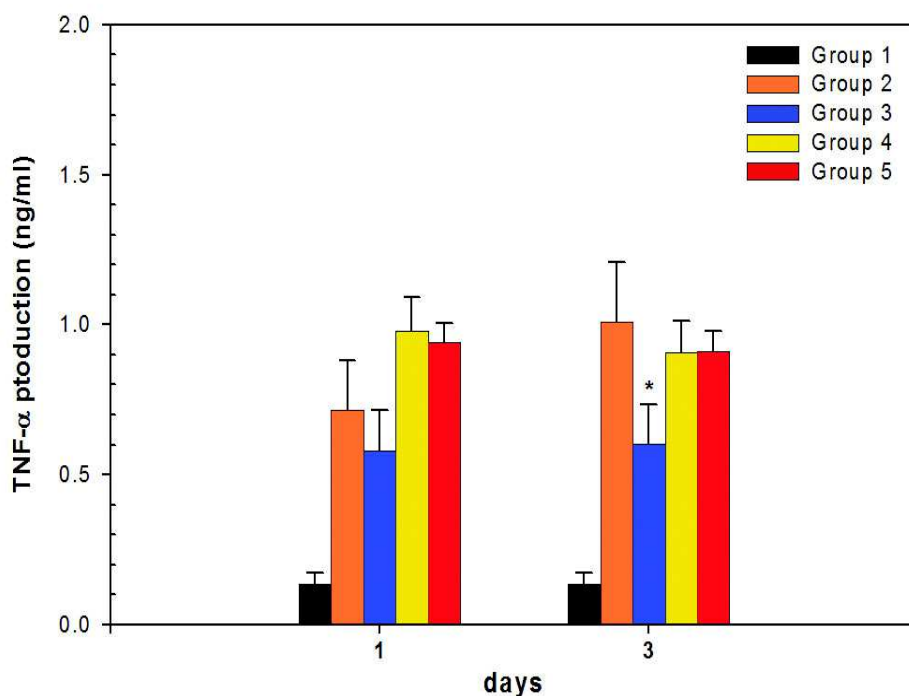


Fig.6. Effects of SQ on the tumor necrosis factor (TNF- α) production in the presence of *C. albicans* (2×10^6 /kg) from mice kidney. *C. albicans* and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment. The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, * $p < 0.05$).

제5절 *C. albicans*-유도 IL-6 생산에 대한 SQ 효과

HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*-유도 염증반응 인자들 중 IL-6 생성량에 미치는 SQ 효과를 관찰하였다. *C. albicans*를 HEK cells에 처치하면 IL-6 생성량이 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. SQ를 처치한 군중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 IL-6 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Table 6, Fig. 7).

Table 6. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of *C. albicans* from HEK 293 cells at 12 hour. (units: pg/ml proteins)

<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>	<i>Group 6</i>
1647.1±49.8	5805.4±168.2	6672.9±118.2	3304.7±50.1*	5657.8±71.4	7337.2±105.7

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was immediately treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was immediately treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, * $p < 0.05$).

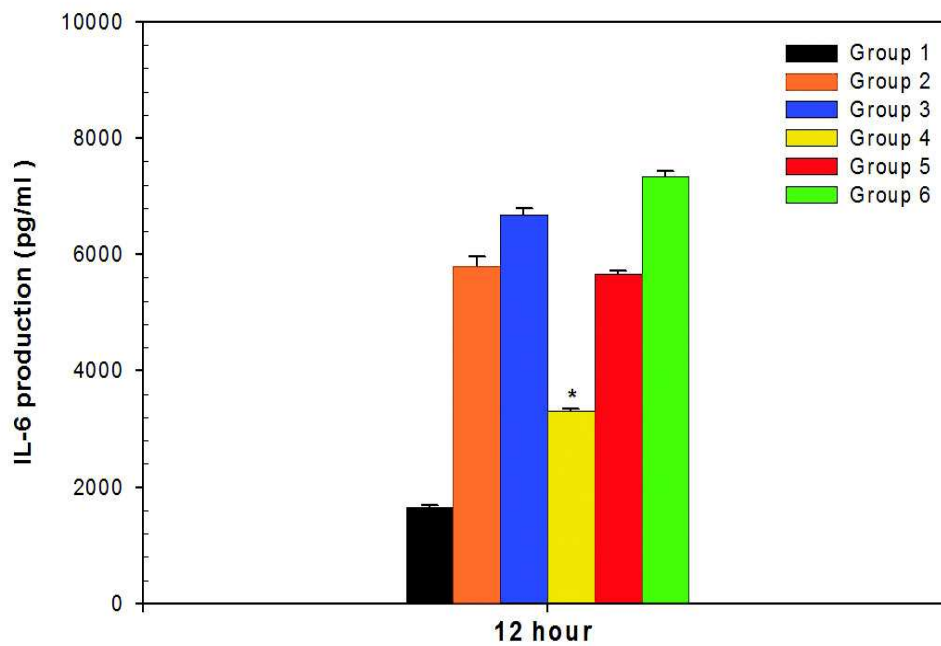


Fig.7. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) from HEK 293 cells.

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 5: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.05%/ml) was treated

Group 6: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.1%/ml) was treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD,

*p<0.05).

생쥐에 *C. albicans*를 감염(복강투여, 2×10^6 /kg)시킨 후, IL-6 생성량을 신장 조직을 통해 오염 후 1일, 3일 경과 후 관찰하였다. SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염 시킨 군에서 3일째 군에서만 신장 조직 내에서의 IL-6 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$)(Table 7, Fig. 8).

Table 7. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of *C. albicans* from mice kidney. (unit: ng/ml proteins)

	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>
1 day	0.09±0.05	0.49±0.09	0.36±0.11	0.67±0.09	0.68±0.10
3 day	0.09±0.04	0.73±0.19	0.40±0.09*	0.64±0.08	0.71±0.08

C. albicans and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, * $p < 0.05$).

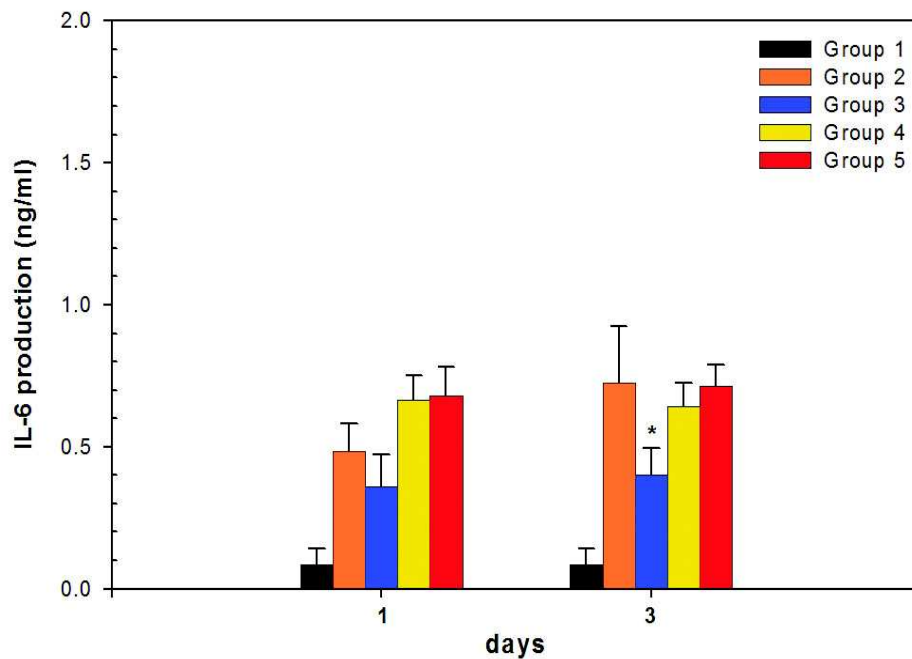


Fig.8. Effects of SQ on the interleukin-6 (IL-6) production in the presence of *C. albicans* (2×10^6 /kg) from mice kidney. *C. albicans* and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, *p<0.05).

제6절 *C. albicans*-유도 Caspase-3 생산에 대한 SQ 효과

HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*-유도 Caspase-3 생성에 대한 SQ 효과를 관찰하였다. *C. albicans*는 Caspase-3 생성량을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. SQ를 처리한 군중에서는 *C. albicans*를 처리하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 Caspase-3 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다 ($p < 0.05$)(Table 8, Fig. 9).

Table 8. Effects of SQ on the Caspase-3/ CPP 32 activity in the presence of *C. albicans* from HEK 293 cells at 12 hour. (units: O.D. 405 nm)

<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>	<i>Group 6</i>
0.15±0.02	0.72±0.04	0.66±0.04	0.56±0.04*	0.67±0.06	0.70±0.07

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was immediately treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was immediately treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, * $p < 0.05$).

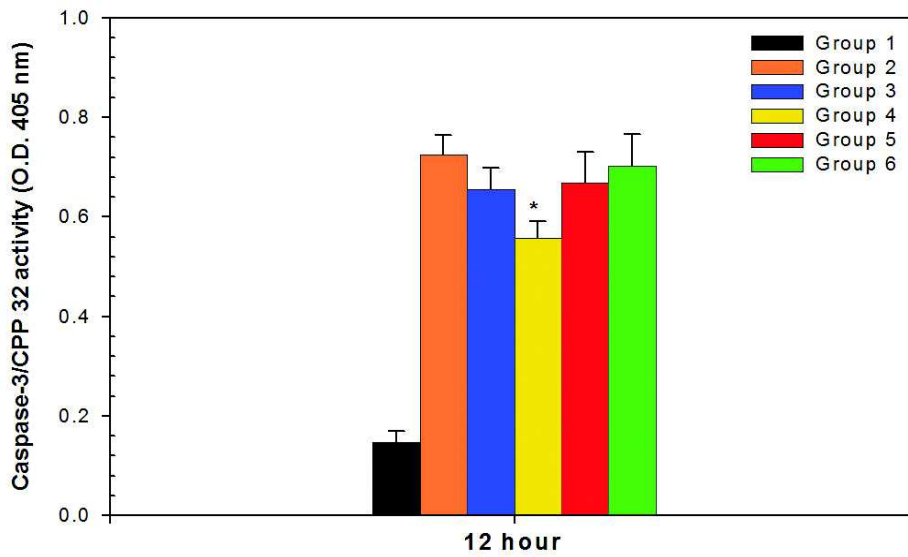


Fig.9. Effects of SQ on the Caspase-3/ CPP 32 activity in the presence of *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) from HEK 293 cells.

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$)

Group 5: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.05%/ml) was treated

Group 6: After treated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$), SQ (0.1%/ml) was treated

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD, *p<0.05).

생쥐에 *C. albicans*를 감염(복강투여, $2 \times 10^6/kg$)시킨 후, Caspase-3 생산에 대한 SQ 효과를 신장 조직을 통해 감염 후 1일과 3일 경과 후 관찰하였다. SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염시킨 3일째 군에서 신장 조직 내에서 Caspase-3 생성량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(p<0.05)(Table 9,

Fig. 10).

Table 9. Effects of SQ the Caspase-3/ CPP 32 activity in the presence of *C. albicans* from mice kidney. (units: O.D. 405 nm)

	<i>Group 1</i>	<i>Group 2</i>	<i>Group 3</i>	<i>Group 4</i>	<i>Group 5</i>
1 day	0.20±0.06	0.77±0.09	0.74±0.04	0.68±0.03	0.77±0.06
3 day	0.21±0.05	0.68±0.10	0.43±0.02*	0.72±0.04	0.75±0.11

C. albicans and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.)

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean±SD, *p<0.05).

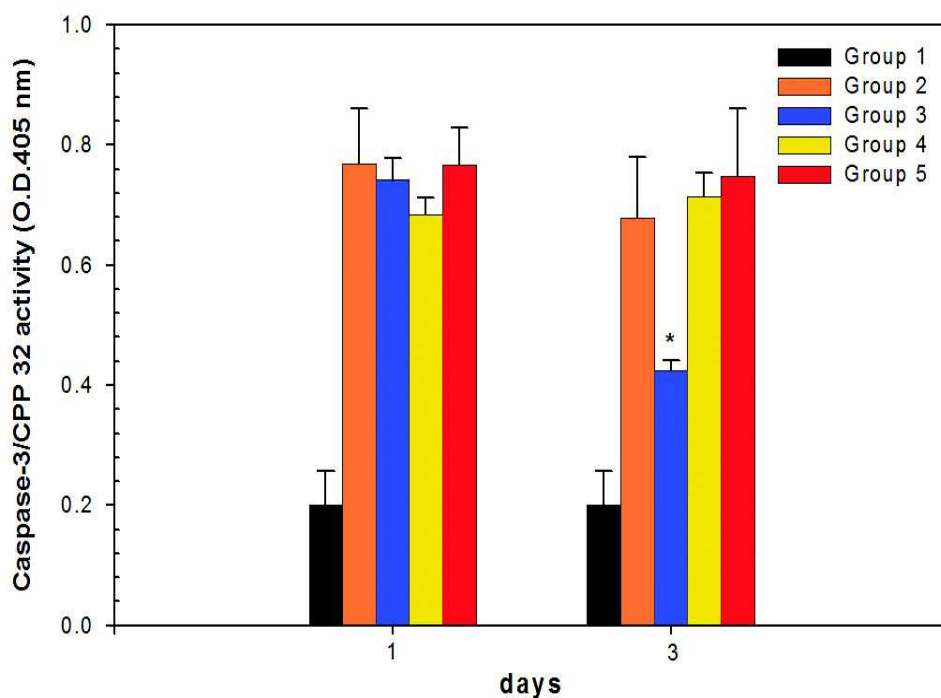


Fig.10. Effects of SQ (80ml/kg) on the Caspase-3/CPP 32 activity in the presence of *C. albicans* (2×10^6 /kg) from mice kidney. *C. albicans* and SQ injected intraperitoneal injection (i.p.).

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (2×10^6 /kg) only

Group 3: Treated with the SQ (80ml/kg) for 7 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 4: Treated with the SQ (80ml/kg) for 3 days (one per days) and later were injected with *C. albicans* (2×10^6 /kg)

Group 5: After treated with *C. albicans* (2×10^6 /kg), SQ (80ml/kg) was treated

All groups were observed at 1 and 3 days after *C. albicans* treatment.

The results are expressed as compared with Group 2 (mean \pm SD,

* $p < 0.05$).

제7절 *C. albicans*-유도 TNF- α , IL-6에 대한 SQ의 Western blot 결과

C. albicans-유도 TNF- α , IL-6에 대한 SQ의 효과를 Western blotting 방법을 통해 단백질 수준에서의 결과를 관찰하였다(Fig. 11).

mRNA level이나 serum protein을 이용한 TNF- α , IL-6의 결과와 마찬가지로 *C. albicans*는 TNF- α , IL-6의 발현을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 SQ를 pre-treated한 군에서 TNF- α , IL-6의 발현량을 감소시켰으며, post-treated 군에서는 SQ (0.1%/ml)군에서도 TNF- α , IL-6의 발현량을 유의하게 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다.

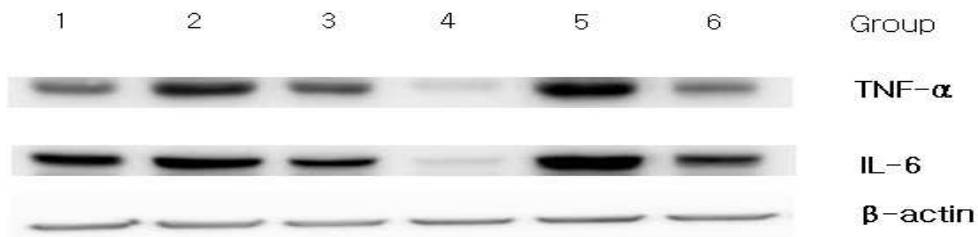


Fig.11. Effect of SQ on lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-6 expression in HEK 293 cells at 12 hour. Total cellular proteins were prepared and Western blotted for TNF- α and IL-6 monoclonal antibody. β -actin was used an internal control.

Group 1: Control

Group 2: *C. albicans* (3×10^6 /ml) only

Group 3: Treated with the SQ (0.05%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 4: Treated with the SQ (0.1%/ml) for 30 min and later were incubated with *C. albicans* (3×10^6 /ml)

Group 5: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.05%/ml) was treated

Group 6: After treated with *C. albicans* (3×10^6 /ml), SQ (0.1%/ml) was treated

제8절 *C. albicans*-유도 $NF-\kappa B$ 발현에 대한 SQ 효과

HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*-유도 $NF-\kappa B$ 발현에 대한 SQ 효과를 관찰하였다. *C. albicans*는 $NF-\kappa B$ 발현을 증가시키는 것을 관찰할 수 있었다. SQ (0.1%/ml)를 처리한 군중에서는 3시간째 군에서만 $NF-\kappa B$ 발현량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

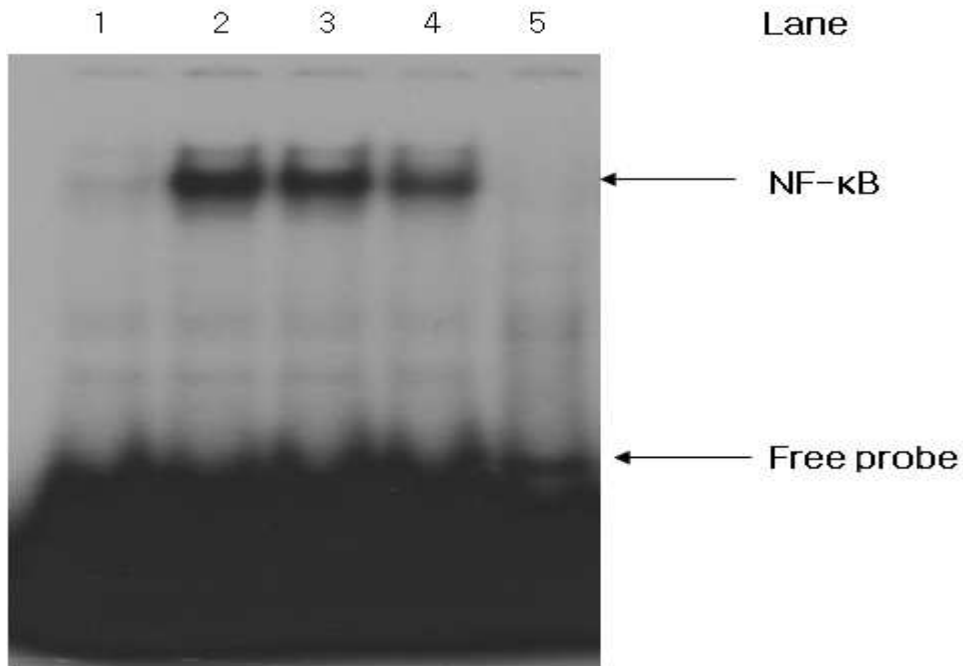


Fig.12. Effect of SQ (0.1%/ml) on lipopolysaccharide-induced $NF-\kappa B$ activation in HEK 293 cells.

The cells were treated with the SQ for 30 min and later were incubated with *C. albicans* ($3 \times 10^6/ml$) for 1 and 3 hours.

Gel shift assay was carried out using nuclear extracts from control (lane 1), only *C. albicans* (lane 2, 3: 1, 3 hour), treated with *C. albicans* and SQ (lane 4, 5: 1, 3 hours)

제4장 고찰

본 연구에서는 *Candida* 속 진균 중에서도 피부, 구강 및 질의 점막에 기생하고 있다가 숙주 동물의 저항력을 약화시키는 영양장애, 만성소모성질병, 수술 및 다른 질병으로 인하여 항균제 및 steroid제, 면역억제제 등을 오랫동안 사용하여 면역기능이 저하되어 기회감염(opportunistic infection)을 일으키는 병원성이 강하고, 가장 빈번히 질병을 유발시키는 *C. albicans*-유도염증 반응에 대해 SQ (squalene)의 전처치(pre-feeding treatment)가 human embryonic kidney cells line (HEK 293 cells)을 이용한 *in vitro* 실험과 mouse kidney tissue를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 *C. albicans*-유도 급성 염증반응을 경감 시키는 것을 관찰하였다. *C. albicans*에 천연무독성 착화제인 키토산을 일정 농도 처치하면, *C. albicans*에 대하여 apoptosis를 유발시키다가 시간이 경과함에 따라 괴사가 진행 되고, 또한, 항균 활성도가 강함이 보고 되었다(Oh *et al.*, 2000; Chee, 2006).

살아있는 *C. albicans* (LCA)와 열처치한 *C. albicans* (KCA)는 인체말초혈액을 이용한 실험에서 단독으로도 시간의 차이는 있지만, IL-6을 모두 발현시키고, LPS(10 μ g/ml) 혹은 TNF- α (50-100ng/ml)를 처치한 경우에도 IL-6 가 발현이 유도된다(Kim *et al.* 1995). 인체말초혈액 단핵세포는 *C. albicans*에 자극을 받는 동시에 IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8등의 cytokines를 분비하는데, *C. albicans*를 감염시키면 감염 6시간 후부터 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등 pro-inflammatory cytokine의 발현이 현저히 증가 한다(Castro *et al.*, 1996; Bay *et al.*, 2002; Kim, 2006). 본 실험에서도 인체 신장세포주(HEK 293 cells)에 *C. albicans*를 감염시켜 염증반응 인자들이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다.

RAW 264.7 대식세포주에 LPS-유도 염증반응을 일으킨 후, saponin의 proto-panaxadiol type인 protopanaxadiol (PPD)을 농도별 (25~200ug/ml) RAW 264.7 대식세포에 함께 처치해 주면 LPS-유도 NO, COX-2, IL-1 β , TNF- α 생성이 PPD 선량에 비례하여 감소된다(Lee *et al.*, 2006). 그리고 RAW 264.7, 세포주에 LPS-유도 염증 반응을 유발시킨 후, 인진호탕과 그 약재들을 처치하면, NO 생성량과 iNOS 발현을 크게 감소시키고, TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성량도 크게 감소시킨다(Yun *et al.*, 2008).

또한, RAW 264.7 대식세포주에 LPS-유도 염증반응을 일으킨 후, *PersicariaIapathifolia* (Polygonaceae)에서 추출한 Quercitringallate (QNG)를 농도별

(0-100uM)로 처치해 주면, IL-6 발현량이 농도에 비례하여 감소하고, NF-κB 활성을 30분 전에 억제시키다가 다시 회복되어진다(Min *et al.*, 2006).

RAW 264.7 cells에서 차가 버섯 에탄올 추출물의 경우 LPS로 유도된 IL-1β, IL-6의 분비를 유의성 있게 증가시키며, LPS는 IL-1β, IL-6의 (3, 10, 30, 100μg/ml)농도를 의존적으로 유의성 있게 감소되고, 차가추출물은 IL-1β, IL-6의 pro-inflammatory cytokine을 억제시킨다(Byun, 2005). 본 실험에서는 HEK cells에 *C. albicans*를 처치하여서 염증 반응을 유도하였는데, LPS-유도 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현량을 SQ 농도의 차이에 따라 감소시키는 것을 관찰할 수 있어 농도차를 실험에 고려해야 할 것으로 사료된다. 또한, LPS-유도 NF-κB 활성의 경우 SQ를 처치한 군의 경우 1시간째에서는 효과를 나타내지 못하였지만, 3시간째 군의 경우 효과가 관찰되어 시간의 차이를 고려해야 할 것으로 사료된다.

생쥐 대식세포주에 당귀, 어성초, 오가피, 황기 등의 한약재추출물을 IFN-gamma와 처치하면 NO와 TNF-α 생산은 IFN-gamma와 추출물 농도에 의존적으로 유도되어지고, LPS를 단독으로 처치한 경우 NO 농도가 증가하지만, 오가피를 같이 처치한 경우는 NO 농도가 감소되어진다. 그러나 한약재 추출물을 단독 처치한 경우에는 cytokine의 생산에는 영향을 주지 못한다(Yee *et al.*, 2000). 현삼(Scrophulariae, SRE) 메탄올 추출물의 경우도 LPS로 유도된 대식세포에서의 cytokines의 level, nitric oxide production, iNOS 및 COX-2의 발현에 미치는 영향에서 NO, iNOS, IL-1β, TNF-α의 생성량을 유의하게 억제시킨다(Byun *et al.*, 2005). 또한, 토복령(*Smilacis glabrae* rhizome)의 경우 human fibroblast-like synoviocyte (hFSL)에서 proinflammatory cytokines인 iNOS, IL-1β, TNF-α, IL-6의 생성을 농도차(1, 10, 100μg/ml)에 의존하여 억제시킨다(Oh *et al.*, 2003).

본 연구에서는 SQ를 농도별(0.05, 0.1%/ml)로 human embryonic kidney cells line인 HEK 293 cells에 pre or post-처치하였는데, *C. albicans*를 HEK 293 cells에 처치한 다음, SQ를 처치한 경우(post-treatment)에는 효과를 관찰하지 못하였으나, 세포배양액에 SQ 용액을 넣고 30분후에 *C. albicans*를 cells에 처치한 군(pre-treatment)의 경우에는 *C. albicans*-유도 염증반응 인자들인 IL-1β, TNF-α mRNA 발현량 및 NF-κB, caspase-3 활성 억제에 SQ 농도 및 처치 방식, 시간에 의존하여 감소시키는 것을 관찰할 수 있었다.

IL-1β와 amyloid β peptide에 의해 활성화 된 human astrocytoma cells의 경우 TNF-α, IL-6등의 생산량이 증가한다. 그러나 수용성키토산을 세포 배양을 할 때 자

극원(stimulators)보다 먼저 선처치(pre-feeding)하면 TNF- α , IL-6등의 생산량 및 iNOS 발현량을 감소시킨다(Kim *et al.*, 2002). 본 연구에서도 SQ를 *C. albicans*보다 먼저 세포배양액에 넣고 배양(30분간)한 *in vitro* 실험과 SQ를 실험동물에 *C. albicans* 감염 7일 전에 처치한 *in vivo* 실험에서 염증반응 인자들의 감소 결과를 관찰하였다. 그러나 *C. albicans* 감염 후에 SQ를 처치한 후처치(post-treatment groups)의 경우에는 모두 별 효과가 없음이 관찰되었다.

본 연구를 통해 *C. albicans*는 신장조직에 급성염증 반응을 유도하는 것을 알 수 있었다. 그러나 *C. albicans*-유도 급성 염증반응에 대해 SQ의 처치가 농도 및 투여 방식에 따라 염증반응 정도를 억제시키는 것을 실험적으로 알 수 있었다.

결론적으로, 본 연구를 통해 SQ가 예방적 측면에서 *C. albicans*-유도 면역억제에 대해 회복 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

제5장 결론

본 연구에서는 *Candida* 속 진균 중에서도 피부, 구강 및 질 점막에 기생하고 있다가 숙주 동물의 저항력을 약화시키고, 병원성이 강하며, 동물에 질병을 유발시키는 *C. albicans*-유도 염증반응에 대해 SQ의 처치를 통해 염증반응을 경감시키는가에 대해 확인하였다.

실험동물 (ICR계 생쥐) 및 HEK 293 cells를 이용하여 *in vitro* 와 *in vivo*로 실험을 하였다. *C. albicans*-유도 염증인자 중 IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA, IL-6 mRNA는 RT-PCR 방법, TNF- α , IL-6, NO, Caspase-3 는 ELISA kits 방법, TNF- α , IL-6 단백질 발현은 Western blot방법, NF- κ B는 EMSA 방법을 이용하여 관찰하였다.

실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HEK 293 cells에 대한 SQ 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.5%/ml)에서는 세포독성이 관찰되지 않았다.
2. HEK 293 cells에서 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA가 *C. albicans*에 의해 강하게 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. SQ (0.05, 0.1%/ml)를 처치한 경우 *C. albicans*-유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현량을 감소시키는 것을 관찰할 수 있었으나, SQ (0.01%/ml)는 *C. albicans*-유도 IL-1 β , TNF- α , IL-6 mRNA 발현량에 별 효과가 없음을 알 수 있었다.
3. HEK 293 cells에서 *C. albicans*는 NO 생산량을 강하게 증가 시키는 것을 관찰할 수 있었다. SQ를 처치한 군중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ(0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(p<0.05). 그리고 *in vivo*의 경우에는 *C. albicans*를 감염시킨 군에서 1, 3일째 모두 신장 조직 내에서의 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(p<0.05).
4. HEK 293 cells에서 SQ를 처치한 군중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated한 군에서만 유의하게 TNF- α 생산량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(p<0.05). *in vivo*의 경우에는 *C. albicans*를 감염(복강투여)시킨 후, TNF- α 생성량을 신장조직을 통해 감염 후 1, 3일 경과 후 관찰하였다. SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염시킨 군에서 3일째 군에서만 신장 조직 내에서의 TNF- α 생성량을 감소시키는 것

을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

5. HEK 293 cells에서 *C. albicans*는 IL-6 생성량 증가를 유도시키며, SQ를 처치한 군 중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 IL-6 생산량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). *in vivo*의 경우에는 *C. albicans*를 감염 시킨 군에서 3일째 군에서만 신장 조직 내에서의 IL-6 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).
6. HEK 293 cells에서 SQ를 처치한 군 중에서는 *C. albicans*를 처치하기 30분 전에 SQ (0.1%/ml)를 pre-treated 한 군에서만 유의하게 Caspase-3 생산량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). *in vivo*의 경우에는 SQ (80ml/kg)를 7일간 1일 1회 pre-treated(복강투여)한 다음, *C. albicans*를 감염 시킨 3일째 군에서 신장조직 내에서의 Caspase-3 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).
7. HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*는 Western blotting 방법에서 TNF- α , IL-6 단백질 발현을 증가시키고, NF- κ B 발현 증가를 유도시키는 것을 관찰할 수 있었다. *in vivo*의 경우에는 SQ (0.1%/ml)를 처치한 군 중에서는 3시간째 군에서만 NF- κ B 발현량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).
8. HEK 293 cells에 대한 *C. albicans*는 NF- κ B 발현 증가를 유도시키는 것을 관찰할 수 있었다. *in vivo*의 경우에는 SQ (0.1%/ml)를 처치한 군 중에서는 3시간째 군에서만 NF- κ B 발현량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

결론적으로 Squalene이 *C. albicans*-유도 염증 인자들의 억제를 위해서는 예방적 차원에서 SQ를 공급하는 것이 효과가 있음을 알 수 있었다. 따라서 SQ 처치가 *C. albicans*-유도 면역억제에 대해 회복 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Arany, I, Bryst, M. M, Brisk, H and Trying, S.K. "Nitric oxide regulation of inducible nitric oxide synthases mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes." Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:378-383, 1996.
- Baradkar, V.P, Mathur, M. Kulkarni, S.D and Kumar, S. "Thoracic empyema due to *Candida albicans*" Indian J. Pathol. Microbiology. 51(2): 286-288, 2008.
- Bay, S.W, Jang, Y.S and Hahn, Y.H. "The effect of candida albicans and dexamethasone on the secretion of tumor necrosis factor- α from cultured human keratocytes." J. Kor. Ophthalmol. Soc. 43(10):2010-2016, 2002.
- Byun, B.H. "Effects of Inonotus obliquus Ethanol Extact on Cytokine Expression in Raw 264.7 cells" Kor. J. Herbology: 20(2):55-60 2005.
- Byun, S.H, Yang, C.H and Kim, S.C. "Inhibitory effect of scrophulariae radix extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and nitric oxide production in lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells." Kor. J. Herbology. 20(2):7-16, 2005.
- Castro, M, Bjoraker, J.A, Rohrbach, M.S and Limper, A.H. "*Candida albicans* induces the release of inflammatory mediators from human peripheral blood monocytes." Inflammat. 20(1):107-122, 1996.
- Chee, H.Y. "Antifungal activity of chitosan on *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* and its induction of apoptosis." Kor. J. My Col. 34(2):119-121, 2006.
- Chinthalapally, V.R, Harold, L.N and Bandaru, S.R. "Chemopreventive effect of squalene on colon cancer." Carcinogenesis. 19(2):287-290, 1998.

- Cho, S.D, Kim, Y.H, Kim, Y.K, Kim, S.S, Ko, C.U and Lee, B.J. "Interleukin-6 level as a marker of disease activity in Rheumatoid Arthritis." J. Kor. Orthop. Assoc. 34(2):327-331, 1999.
- Choi, J.H, Suh, M.K and Ha, G.Y. "Isolation and identification of candida species in superficial cutaneous candidiasis." Korean Dermatological Association. 40(10):1188-1194, 2002.
- Debjani, S, Piu, S, Sunita, G, Surajit, B and Mitali, C. "Anti-inflammation effect of allypyrocatechol in LPS-induced macrophages is mediated by suppression of iNOS and COX-2 via the NF- κ B pathway." Int. Immunopharmacol. 8:1264-1271, 2008.
- Dennis, J.S and Michael, A.M. "Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produced nitrate and nitrite in response *E.coli* lipopolysaccharide." Proc. Natl. Acad. Sci. 82(7738-7742), 1985.
- Deva, R, Ciccoli, R and Nigma, S. "*Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: Pivotal roles of Toll-Like Receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF- κ B." J. Immunol. 171:3047-3055, 2003.
- Espada, R, Valdespina, S, Molero, G, Dea, M.A and Torrado, J.J. "Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B." Int. J. Antimicrobial Agents. 32:55-61, 2008.
- Frydas, S, Karagouni, E, Dotsika, E, Reale, M, Barbacane, R.C and Conti, P. "Generation of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-10 in mouse serum from trichinellosis: effect of the anti-inflammatory compound 4-deoxypyridoxine (4-DPD)." Immunology Letters. 49:179-184, 1996.

- Gregory, S.K. "Squalene and its potential clinical uses." *Alter. Med. Rev.* 4(1):29-36, 1999.
- Han, Y.M. "Synergic effect of grape seed extract with amphotericin B against disseminated candidiasis due to *Candida albicans*." *Phytomed.* 14:733-738, 2007.
- Harold, L.N. "Squalene, olive oil, and cancer risk: A review and hypothesis Cancer." *Epidermology. Biomarkers. Prevent.* 6:1101-1103, 1997.
- Hirano, T. "Molecul-Biology of cytokines." World science. 1-3, 2002.
- Karlowicz, M.G. "Candidal renal and urinary tract infection in neonates. "Seminar in Perinatol. 27(5):393-400, 2003.
- Kim, H.S, Lee, Y.S and Kim, S.K. "*Candida albicans* induced interleukin-6 gene expression of human peripheral blood lymphocyte." *J. Kor. Soc. Microbiol.* 30(4):463-471, 1995.
- Kim, H.S. "Gene expression of human monocytes in response to *Candida albicans* by microarray and its clinical application." *Kor. J. Perinatol.* 17(1):19-24, 2006.
- Kim, J.Y, Park, S.J, Yun. K.J, Cho, Y.W, Park, H.J and Lee, K.T. "Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages." *European. J. Pharmacol.* 584:175-185, 2008.
- Kim, K.H, Lee, G, Lee, H.S, Kim, C.D, Hyun, J.H and Ahn, B.O. "The serum tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in experimental acute pancreatitis of the rats." *Kor. J. Gastroentero.* 34:238-244, 1999.

- Kim, M.S, Sung, M.J, Seo, S.B, Yoo, S.J, Lim, W.K and Kim, H.M. "Water-soluble chitosan inhibits the production of pro-inflammatory cytokine in human astrocytoma cells activated by amyloid β peptide and interleukin- 1β ." *Neurosci. Letter.* 321:105-109, 2002.
- Kwon, Y.B. "Pathological studies on experimental nephritis induced *Candida albicans* in mice." *Kor. J. Lab. Ani. Sci.* 10(1):177-184, 1994.
- Lee, J.H, Han, Y.M. "Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4+ T cells." *Int. Immunopharmacol.* 6:1424-1430, 2006.
- Lee, J.S, Oum, B.S, Park, C.H and Kim, Y.S. "The effects of nitric oxide synthesis and cellular metabolic activity by glucose, interleukin- 1β , and transforming growth factor- β_1 in human umbilical vascular endothelial cells" *Ophthalmology.* 40(11):28-38, 1999.
- Lee, W.M, Kim, S.D, Kim, K.S, Song, Y.B, Kwak, Y.S, Choi, J.Y, Oh, J.W and Rhee, M.H. "Protopanaxadiol modulated LPS-induced inflammatory activity in muine macrophage RAW 264.7 cells." *J. Ginseng. Res.* 30(4):181-187, 2006.
- Leon, L.L, Jeannin, J.F and Bettaieb, A. "Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): Implication in cancer cells apoptosis." *Nitric Oxide.* 19:77-83, 2008.
- Li, T.Z, Lee, S.J, Park, S.J, Chang, B.J, Kim, K.S and Choe, N.H. "The effects of air-borne particulate matters on the alveolar macrophage for the TNF- α and IL- 1β secretion." *Kor. Tuberc. Respir. Dis.* 60:554-563, 2006.

- Min, K.R, Kim, B.H, Chang, Y.S and Kim, Y.S. "Quercitrin gallate down-regulates interleukin-6 expression by inhibiting nuclear factor- κ B activation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages." *Natural Product Sci.* 12(2):113-117, 2006.
- Mohaya, M.A.A, Darwazeh, A, Khudair and W.A, Jordan, I. "Oral fungal colonization and oral candidiasis in renal transplant patients: The relationship to *Miswak* use." *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Radiol. Endod.* 93:455-460, 2002.
- Nakagawa, M, Yamaguchi, T, Fukawa, H, Ogata, J, Akiyama, S and Kuwano, M. "Potentiation by squalene of the cytotoxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor." *Jpn. J. Cancer. Res.* 76(4):315-320, 1985.
- Nampoory, M.R.N, Khan, Z.U, Johny, K.V and Chung, T.D. "Invasive fungal infections in renal transplant recipients." *J. Infect.* 33:95-101, 1996.
- Netea, M.G, Gijzen, K, Coolen, N, Verschueren, I, Figdor, C, Meer, J.W.M, Torensma, R and Kullberg, B.J. "Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages." *Microbes and Infect.* 6:985-989, 2004.
- Oh, S.K, Park, J.O, Kang, T.L and Kim, D.H. "Smilacis glabrae rhizome inhibits synthesis of inflammatory cytokines induced by IL-1 β and TNF- α in cultured human synovial cells." *Kor. J. Herbol.* 18(1):49-64, 2003.
- Oh, S.W, Hong, S.P, Kim, H.J and Choi, Y.J. "Antimicrobial effects of chitosan on *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus* and *Candida albicans*." *Kor. J. Food. Sci. Technol.* 32(1):218-224, 2000.

- Park, J.H, Lee, K.W, Chon, S.E, Kim, S.J, Lee, B.B and Joh, J.W. "*Candida* polyarthritis in a renal transplant patients." Kor. J. Soc. Transplant. 15:237-239, 2001.
- Rui, H.L and Joseph, H.H. "Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review." Mut. Res. 339:73-89, 1995.
- Saint-Leger, D, Bague, A, Cohen, E and Chivot, M. "A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. *In vitro* study of squalene oxidation." Br. J. Dermatol. 114:535-542, 1986.
- Smith, T.J. "Squalene: potential chemopreventive agent." Expert. Opin. Investig. Drugs. 9(8):1841-1848, 2000.
- Strandberg, T.E, Tilvis, R.S and Miettinen, T.A. "Effects of cholestyramine and squalene feeding on hepatic and serum plant sterols in the rat." Lipid. 24(8):705-708, 1989.
- Straub, R.H, Härle, P, Stebner, K, Kees, F, Falk, W and Schölmerich, J. "Key role of the sympathetic microenvironment for the interplay of TNF and IL-6 in normal but not in inflamed mouse colon mucosa." BMJ. 1-16. 2005.
- Stuehr, D.J, Gross, S.S, Sakuma, I, Levi, R and Nathan, C.F. "Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide." J. Exp. 169:1011-1020, 1989.
- Suh, H.Y, Choi, B.K, Choi, S.H, Cho, K.S, Kim, C.K and Chai, J.K. "The effect of sonicated extracts of *Treponema Denticola* and *Treponema Kechithinolyticum* on the cytokine secretion and matrix metalloproteinase activation of gingival

- fibroblast." Kor. J. Periodontol. 29(4):979-995, 1999.
- Tatu, A.M and Hannu, V. "Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding." Am. J. Clin. Nutr. 59:356-363, 1994.
- Veroux, M, Macarone, M, Fiamin.go, P, Cappello, D and Veroux, P. "Caspofusing in the treatment of Azole-refractory esophageal candidiasis in kidney transplant recipients." Transplantat. Proceeding. 38:1037-1039, 2006.
- Wink, D.A, Ridnour, L.A, Hussain, S.P and Harris, C.C. "The reemergence of nitric oxide and cancer." Nitric oxide. 19:65-67: 2008.
- Yamagucji, T, Nakagawa, M, Hidaka, K. Sasaki, T, Akiyama, S and Kuwano, M. "Potentiation by squalene of antitumor effect of 3-[(4-aminoi-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-1-(2-chlorpethyl)-nitros ourea in a murine tumor system." Jpn. J. Cancer. Res. 76(10):1021-1026, 1985.
- Yee, S.T, Jeong, Y.R, Ha, M.H and Kim, S.H. "Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages." J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr. 29(2):342-348, 2000.
- Yoo, S.C, Suh, J.S. "Antifungal actions of crude drug water extracts on *Candida albicans*(I)." Kor. J. Pharmacog. 5(3):147-154, 1974.
- Yoo, S.Y and Namkoong, M.K. "Acute renal failure caused by fungal bezoar: A late complication of *Candida* sepsis association with central catheterization."J. Pediatric Surgery. 30(11):1600-1602, 1995.
- Yoon, H.J, Moon, M.H, Park, H.S., Im, S.Y and Kim, Y.H. "Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells." Biochemical. Biophysical. Res. Commun(BBRC). 358: 954-959, 2007.

Yun, H.J, Heo, S.K, Yi, H.S, Kim, C.H, Kim, B.W and Park, S.D.
"Anti-inflammatory effect of Injinho-tang in RAW 264.7 cells." Kor. J. Herbol.
23(2):169-178, 2008.

저작물 이용 허락서

학 과	생 물 학 과	학 번	20057380	과 정	박사
성 명	한글 이 준 행	한문 李 俊 行	영문 Lee Jun Haeng		
주 소	광주광역시 광산구 신창동 신가부영아파트 104-405				
연락처	E-mail : jj1809@nambu.ac.kr				
논문제목	한글 : <i>In vitro</i> 와 <i>In vivo</i> 상에서 <i>Candida albicans</i> 로 유도한 염증인자에 미치는 Squalene의 효과				
	영문 : The Effects of Squalene on inflammation factors induced by <i>Candida albicans</i> <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함. 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함. 6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음. 7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함. <p style="text-align: center;"> 동의여부 : 동의(<input checked="" type="checkbox"/>) 반대(<input type="checkbox"/>) 2009 년 02 월 일 저작자: 이 준 행 (인) </p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">조선대학교 총장 귀하</p>					