

최 종

연구보고서

지방축적 조절 및 면역 활성 증강에
관여하는 천연물의 탐색방법 개발

Development of a new technical method for
screening of modulator of lipid deposition and
immunostimulant from plant extracts.

연구 기관

충북대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “지방축적 조절 및 면역 활성 증강에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발”과제 의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11월 14일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 정 정 수

세부연구책임자 : 정 정 수

연 구 원 : 이 현 미

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 조 병 수

연 구 원 : 최 강 덕

연 구 원 : 김 성 도

요 약 문

I. 제 목

지방축적 조절 및 면역 활성화 증강에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

연구목표

- 지방축적 조절에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발
- 면역활성 증강에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발
- 천연물로부터 기능성 사료 개발

중요성

최근에 국내의 많은 의약계 대학에서 천연물에서 추출한 물질을 이용해서 인간의 건강을 증진시키기 위한 연구를 수행하고 있는데, 특히 천연물에서 항암, 면역활성, 비만억제 및 항당뇨 작용을 하는 성분을 찾고 있다. 이렇게 천연물에 대한 연구가 국내에서 활발한 이유는 한국은 생약재를 비롯한 천연물을 광범위하게 사용하고 있고, 또 천연물은 화학적으로 합성한 물질에 비해 부작용이 적고, 더 중요하게는 구조가 밝혀져 있지 않은 천연물에서 미지의 물질을 발견할 수 있다는 기대감 때문으로 사료된다. 천연물을 가축의 생산에 이용할 경우 얻을 수 있는 큰 잇점은 지방축적 조절과 면역활성 작용이다. 지방축적 조절을 잘 활용하면 우리가 원하는 고급육류를 생산할 수 있다. 즉 동물성 지방의 과다 섭취에 의한 성인병 발생이 우려되면 지방축적을 억

제하는 천연물을 이용하고, 육질향상을 위해 높은 근내지방이 요구되면 지방 축적을 증가시키는 천연물을 이용하면 된다. 면역활성을 증가시키는 천연물 이용의 잇점은, 가축과 인체의 잔류가 문제시되는 항생제를 대체할 수 있고, 질병에 대한 저항력을 향상시켜서 효율적으로 축산물을 생산할 수 있다. 인체에서는 좋은 효능이 발견되지 않았지만 가축에서 효능이 좋을지도 모르는 천연물을 탐색하고, 인체의 건강증진에 도움이 되는 한약재의 부산물이 가축에서도 좋은 기능이 있는지 확인하는 것이다. 이에 본 연구에서는 DNA chip 을 포함한 *in vitro* 실험방법에 의해 수백종의 천연물을 1차 screening하고 난 뒤 최종적으로 가축에 급여해서 지방축적 조절과 면역활성을 증가시키는 천연물을 찾아냄과 동시에 탐색방법을 개발함으로써 경제적인 파급효과가 대단히 클 것으로 생각된다.

Ⅲ. 연구 개발 내용 및 범위(연구내용 요약)

본 연구에서는 200여종의 식물 추출물 (주로 한약재 원료) 원료 중에서 지방 축적조절과 면역증강에 관여하는 물질을 찾아내고자 1-2차 년도에 in vitro 실험에 의해 효능이 좋은 2가지 천연물을 확정하고 3차 년도에 돼지에 급여해서 1-2차 년도에 확인한 효능이 돼지에 나타나는지를 확인하고 사료첨가제로서의 개발 가능성을 조사 하였다.

1-2차년도의 in vitro 실험에 의해 20개의 식물 추출물이 지방합성 억제 작용을 나타냈고, 25개의 추출물이 지방세포의 분화를 억제했고 1개의 추출물이 지방세포의 분화를 촉진했다. 면역 증강작용에 있어서는 2개의 천연물이 면역세포의 증식 작용을 촉진했다. 복분자와 홍화를 3차년도의 돼지 사양 실험에 사용했는데, 선발 근거는 두 천연물 모두 면역증강 작용을 나타냈고, 복분자는 지방세포의 분화를 억제했고 홍화는 촉진작용을 나타냈기 때문이다.

1차 사양 실험에서는 시판 사료에 복분자 1%와 홍화 1%를 함유 시켜 4주동안 사양 실험했는데 성장률과 등지방 두께 그리고 지방조직의 지방합성은 처리간에 별 차이가 없었다. 복분자 1% 사양실험에서 CD4/CD8 면역세포의 증가 경향을 나타냈다 . 2차 실험에서는 복분자 0.5% 와 복분자 3%를 함유한 사료를 4주간 급여했는데 복분자 급여량이 증가할수록 1) 증체량이 높은 경향을 나타냈고 2) 등지방 두께도 얇아지는 경향을 나타냈고 3) HDL-cholesterol은 증가하고 LDL-cholesterol은 감소하는 경향이 나타났고 4)혈소판 응집이 감소되어 혈전을 예방하며 혈행 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다. 그리고 면역 기능과 관련해서는 복분자 급여량이 올라갈수록 CD4/CD8 T cell의 비율이 증가함을 나타냈다.

위의 결과는 in vitro 실험에 의해 지방세포분화의 억제 또는 촉진 정도가 돼지 사양 실험의 등지방 두께에 반영이 되었고, 또 면역세포에 대한 작용에도 반영되었다. 그래서 본 연구에서 개발한 지방축적 조절과 면역활성증강에 측정방법이 적절함을 나타낸다. 아울러 복분자가 돼지의 생산성 향상을 위한 사료 첨가제로 개발될 가능성을 보여주었다.

IV. 연구 결과의 활용과 건의

본 연구는 천연물이용을 우리의 산업과 건강에 활용하는 방법개발에 역점을 두고 추진된바, 천연물 탐색 뿐 아니라 향후 새로운 물질 개발에 적용이 가능하다. 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내 관련 기관에 이전하고자 한다.

◆ 활용분야

- 가. 맞춤형 축산물 생산을 요구하는 축산 분야
- 나. 무항생제 축산물 생산 분야
- 다. 기능성 사료 또는 식품 개발 분야
- 라. 신의약 개발 분야

Summary

Two hundred plant extracts were tested *in vitro* for their ability to modulate lipid deposition and immunostimulation in the pig. Two plant extracts were selected for further *in vivo* study to confirm their efficacy in growing pigs.

In studies of pig preadipocytes in culture, twenty plant extracts decreased lipogenesis, twenty-five plant extracts decreased differentiation of preadipocytes and one extract increased differentiation. In studies of pig lymphocytes, two plant extracts showed immunostimulant action. Raspberry and safflower were tested *in vitro*, as extracts of these plants showed both immunostimulant actions and affected differentiation of preadipocytes.

In the first *in vivo* study, raspberry and safflower were added at one percent to the pig diet. The control diet did not contain either plant extract. Pigs of 80 kg body weight were fed these diets for 4 weeks. Safflower tended to increase backfat thickness and lipogenesis in adipose tissue. Raspberry increased CD4/CD8 lymphocytes in blood.

In the second *in vivo* study, 0.5% and 3% raspberry were added to the pig diet as above. The control diet did not contain any plant extract. Raspberry tended to affect the following in a dose-dependent manner: 1) increased average daily gain, 2) decreased backfat thickness, 3) increased HDL-cholesterol and decreased LDL-cholesterol, and 4) decreased platelet aggregation. Raspberry also increased CD4/CD8 immune cells in a dose-dependent manner.

These results indicate that the activity of plant extracts *in vitro* was replicated *in vivo*, confirming that the *in vitro* technique for measuring efficacy of plant extracts was appropriate. Raspberry can be used as a feed additive for pig growth and reduction of lipid deposition.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 필요성	1
1. 기술적 측면	1
2. 경제·산업적 측면	2
3. 사회·문화적 측면	3
제 2 장 국내 • 외 기술개발 현황	4
제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	4
제 2 절 앞으로의 전망	6
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	7
제 1 절 천연물이 지방합성과 지방세포 분화에 미치는 영향 (in vitro)	7
제 2 절 천연물이 면역세포의 기능에 미치는 영향 (in vitro)	33
제 3 절 천연물의 급여가 돼지의 지방축적과 면역세포의 작용에 미치는 영향	69
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	101
제 1 절 연구개발 목표달성도	101
제 2 절 관련분야 기술 발전에의 기여도	102
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	103
제 1 절 활용계획	103
제 2 절 활용방안	103
제 6 장 참고문헌	104

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목적

- 지방축적 조절에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발
- 면역활성 증강에 관여하는 천연물의 탐색방법 개발
- 천연물로부터 기능성 사료 개발

연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

최근에 국내의 많은 의약계 대학에서 천연물에서 추출한 물질을 이용해서 인간의 건강을 증진시키기 위한 연구를 수행하고 있는데, 특히 천연물에서 항암, 면역활성, 비만억제 및 항당뇨 작용을 하는 성분을 찾고 있다. 이렇게 천연물에 대한 연구가 국내에서 활발한 이유는 한국은 생약재를 비롯한 천연물을 광범위하게 사용하고 있고, 또 천연물은 화학적으로 합성한 물질에 비해 부작용이 적고, 더 중요하게는 구조가 밝혀져 있지 않은 천연물에서 미지의 물질을 발견할 수 있다는 기대감 때문으로 사료된다. 그러나 몇몇 한약재를 제외하고는 천연물 또는 천연물 정제 부산물을 가축의 생산성 향상을 위한 적용에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그 이유는 농업분야의 연구기관에서 수백종의 천연물을 보유하기 어렵고 또한 연구방법 확립의 어려움 때문일 것이다. 천연물을 가축의 생산에 이용할 경우 얻을 수 있는 큰 잇점은 지방축적 조절과 면역활성 작용이다. 지방축적 조절을 잘 활용하면 우리가 원하는 고급육류를 생산할 수 있다. 즉 동물성 지방의 과다 섭취에 의한 성인병 발생이 우려되면 지방축적을 억제하는 천연물을 이용하고, 육질향상을 위해 높은 근내지방이 요구되면 지방축적을 증가시키는 천연물을 이용하면 된다. 면역활성을 증가시키는 천연물 이용의 잇점은, 가축과 인체의 잔류가 문

제시되는 항생제를 대체할 수 있고, 질병에 대한 저항력을 향상시켜서 효율적으로 축산물을 생산할 수 있다.

현재 국내외에서 인체의 건강증진을 위해 사용되는 천연물은 면역 치료제로 쓰이는 국화과의 한해살이 식물인 도꼬마리(청이자, *Xanthii fructus*), 비뇨기계 염증 억제에 쓰이는 목사과의 개나리(연교, *Forsythia koreana*), 암세포 감수성을 줄이는 삼백초와 약모밀(어성초, *Houttuynia cordata*)등 수 없이 많다. 한편, 국외에서 수행된 가축에서의 천연물의 작용을 보면, 오가피(*Acanthopanax senticosus*)의 돼지의 면역조절 작용(Shen 등, 1991), 마황(*Ephedra sinica*)의 돼지에서의 항염작용(Ling 등, 1995)등이 보고 되었다. 최근에 Chandler와 Mynott(1998)는 파인애플 줄기에서 추출된 bromelain이라는 효소제가 돼지의 설사를 억제한 사실을 보고했으며, 현재 국내의 사료회사에서 파인애플 부산물로 만든 조사료를 태국에서 수입하고 있는 실정이다. 국내에서 천연물의 가축에서의 이용에 대한 연구는 그 수도 적었거니와 주로 한약 부산물에만 국한되어 있다. 이에 대한 주된 이유는 수백종의 천연물을 1차 screening할 연구방법이 확립되어 있지 않아서 이미 인체에서 약효가 알려진 수종의 한약재 부산물만 연구의 대상으로 삼았다. 이 경우의 문제점은 인체에서는 좋은 효능이 발견되지 않았지만 가축에서 효능이 좋을지도 모르는 천연물을 놓칠 수 있고, 인체의 건강증진에 도움이 되는 한약재의 부산물이 가축에서도 좋은 기능이 있다고 단언할 수 없다는 것이다. 더욱이 천연물에 관한 대부분의 연구가 질병치료에 치우쳐 있었다. 이에 본 연구에서는 DNA chip을 포함한 in vitro 실험방법에 의해 수백종의 천연물을 1차 screening하고 난 뒤 최종적으로 가축에 급여해서 지방축적 조절과 면역활성을 증가시키는 천연물을 찾아냄과 동시에 탐색방법을 개발하려 한다.

2) 경제·산업적 측면

국민경제 수준이 높아지면서 고급육의 요구도가 큰데 성인병 발생의 우려 측면에서는 지방이 적은 고기가 선호되고, 반면 근내지방이 많이 함유된 육질이 좋은 고기의 요구도도 높다. 한편 사육환경이 좋지 않아서 돼지, 닭의

사료에 아직도 항생제를 많이 포함시키고 있다. 그러나 지방축적 조절과 항생제 대체 할 수 있는 물질이 개발되어 있지 않다.

3) 사회·문화적 측면

지방축적 조절이나 질병 억제를 위해 항생제 등 인공적으로 제조된 물질에 대한 소비자의 우려가 높은 편이고 생약을 포함한 천연물에 대한 인식은 상당히 좋은 편이어서 천연물을 사료 첨가제로 이용하는 방안에 대한 소비자의 불만은 없을 것이다.

제 2 장 국내 • 외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황과 문제점

1. 국내외 현황

국내

- 생약을 포함한 천연물의 인간의 건강증진을 위한 연구가 국내외 많은 의약계 대학에서 수행되고 있음. 연구의 관심은 질병예방 및 치료 분야인데 주로 항암, 항동맥경화, 비만억제, 면역증강 작용이 관심의 대상임.
- 축산분야에서는 한약제조 부산물을 이용해서 가축의 생산성과 도체특성을 조사했는데 부산물의 품질의 불균일성 때문에 효능이 일정하지 않다.

국외

- 외국에서도 국내처럼 인간의 건강증진이 연구의 중심이나 가축의 생산성 향상을 위한 연구도 상당히 수행되고 있음.
- 외국보다는 국내에서 훨씬 더 많은 천연물(생약재 포함)을 보유, 이용하고 있어서 외국 보다 더 좋은 결과를 기대할 수 있음.

문제점

- 수백종의 천연물을 screening해야지 유용한 미지의 물질을 찾아낼 확률이 큰데 in vitro 실험에 의해 screening할 방법이 없었음.

본 연구기관

- 본 연구책임자의 lab은 지난 15년간 돼지의 지방축적에 관여하는 여러 요인에 대해서 연구해 왔는데 특히, ^{14}C -glucose을 이용한 지방합성 (lipogenesis) 측정, LPL(lipoprotein lipase)와 FAS(fatty acid synthase)등의 지방합성 관련 효소의 작용에 대한 측정을 계속해 왔음.

- 국내 유일하게 갓난 돼지로부터 지방전구세포(Stroma-Vascular cell) 배양방법을 확립해 이들 세포의 분화를 측정할 수 있음.
- 본 협동과제 책임자의 수 천종의 천연물을 보유하고 있어서 유용한 천연물을 선별할 가능성이 높음.

제 2 절 앞으로의 전망

○ 고급육에 대한 요구도와 항생제 대체물질의 요구도가 높은 시점에 본 연구의 결과로 지방 축적 조절과 면역증강을 가져오는 천연물이 탐색되면 경제적, 산업적 이익이 크고, 국내에서는 천연물에 대한 연구가 체계적으로 이뤄질 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 천연물이 지방합성과 지방세포 분화에 미치는 영향.

천연물이 지방축적에 미치는 영향을 규명하기 위해서 돼지의 등지방 조직을 biopsy해서 in vitro로 지방 합성을 측정했고, 그리고 갓난 돼지에서 떼어낸 지방조직으로부터 지방 전구세포를 분리해서 분화정도를 측정했다. 먼저 천연물이 지방합성에 미치는 영향에 대해서 규명하고 난 뒤 지방세포 분화에 미치는 영향에 대해서 설명하고자 함.

1. 천연물이 돼지 지방조직의 지방합성에 미치는 영향.

가. 재료 및 방법

1) 돼지 지방조직의 biopsy

지방합성 측정을 위해서 살아 있는 돼지에서 등지방 조직을 biopsy했다. 체중 85kg 암돼지를 구입해서 약 120kg 까지 키우면서 1주일 2회 마취 없이 제 1늑골 부근을 등지방 2g을 biopsy gun으로 떼어 내었다. 48시간 배양기간 동안 오염을 방지하기 위해서 biopsy 과정 중 sterile condition을 유지했다. 암돼지를 사용한 이유는 수돼지에 비해 지방이 많기 때문이었고 85kg이 되어야 쉽게 지방을 떼어낼 수 있었다. biopsy 후에는 가루 항생제를 상처부위에 뿌려서 염증을 방지하였다.

2) 지방조직의 배양

여러 천연물이 지방합성에 미치는 영향을 규명하기 위해서 CO₂ incubator에서 천연물과 함께 지방조직 절편을 48시간 배양했는데 절편의 크기는 15mg 내외였고 35mm petridish에 3ml의 DMEM으로 배양하였다. 지방합성을 최대화하기 위해서 배양액에 insulin (100ng/ml), hydrocortisone (50ng/ml) 및 transferrin (100ng/ml)을 함유시켰다. 해당 천연물의 추출물도 함께 넣어서 48시간 동안 배양했다.

3) 지방합성의 측정

여러 다른 천연물과 48시간 배양이 끝난 지방조직 절편을 3ml의 KRB 등이 든 20ml 유리 vial에 옮겨서 2시간 동안 shaking waterbath에서 incubation하는 중에 glucose가 total lipid로 전환된 양으로 지방합성을 측정했다. 이를 위해서 3ml의 KRB 용액에는 5mM의 glucose와 0.5u ci의 ^{14}C -Glucose를 tracer로 포함시켰다. 동위원소 ^{14}C -glucose를 incubation 당일에 주입시키는 번거로움을 피하기 위해서 미리 KRB 용액 3ml을 20ml 유리 vial에 넣고 -20°C 에서 보관했다가 실험당일 녹여서 사용했다. 이 KRB 용액은 48시간 지방조직을 배양할 때 사용한 배양액과 같은 농도의 insulin, hydrocortisone 및 transferrin을 함유시켰다. 천연물은 incubation 당일 vial에 들어있는 KRB를 녹일 때 주입시켰고 천연물의 농도는 48시간 배양액의 것과 같았다. 2시간 경과 후 incubation vial을 가루 얼음에 꽂아서 반응을 중지시켰다. 30분 후에 KRB 용액은 버리고 지방조직 절편의 무게를 측정했다. 이 절편을 5ml의 Dole's solution (부피비로 isopropanol:40, n-heptane:10, 1N H_2SO_4 :1)이 든 vial에 넣은 후 ultrasonic water bath에서 30분 동안 지방 추출했다. 이 vial에 3ml의 hexane과 3ml의 H_2O 를 넣은 후 지방이 포함된 상층의 유기용매를 6ml 유리 vial에 넣고 추가로 1.5ml의 hexane을 넣어서 지방을 수집했다. 유기용매를 dry-bath에서 완전히 증발시키고 난 뒤 5ml의 scintillation cocktail을 첨가한 후 liquid scintillation counter로 ^{14}C -lipid의 activity를 측정했다. 지방합성량은 포도당이 지방으로 전환된 양으로 측정했는데 KRB buffer에 함유된 labelling 되지 않은 총 포도당량(5mM, 3ml에는 15ul mol)에 incubation vial에 포함된 총 ^{14}C activity 중 추출된 지방 중에 포함된 ^{14}C -activity의 비율을 곱해서 구했다.

4) 천연물의 수집 및 추출

100g의 천연식물에 500ml의 물을 첨가하여 80°C 로 12시간 추출하여 냉동 건조시킨 후 정량하고 실험에 이용하였다. 건조된 천연 식물 100g에 500ml의 에탄올을 첨가하여 울트라소닉진탕기 내에서 60°C 로 2시간 동안 추출한 것을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 무게를 잰 후 다시 에탄올로 녹여 농도를 맞추고 실험에 이용한다. 에탄올로 추출한 후 남은 것을 건조시킨 후 물

로 80°C로 2시간 추출하여 냉동 건조 시킨 후 무게를 재고 실험에 이용하였다.

나. 결과 및 고찰

지방축적조절에 관여하는 천연물을 탐색하기 위해서 살아있는 돼지에서 지방조직을 떼어내어(biopsy), 48시간동안 culture하고 난 뒤 2시간 incubation 하는 동안 glucose가 lipid로 전환된 양으로 지방합성을 측정했다. 수행한 주 내용은 1) 지방합성을 측정하기 위한 적정조건 확립 2) 천연물 191종의 지방합성 조사 3) 191종중 지방합성을 억제한 5종 선발해서 농도별 작용구명을 수행했는데 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 191종의 천연물 작용은 대조구에 비해서 얼마나 증가 또는 감소되는 지를 표시했는데, 대조구는 각 천연물을 녹이는 용매를 사용했다.

1) 지방합성 측정 위한 적정조건 확립

가) 호르몬의 작용

돼지의 지방조직의 지방합성 측정을 위한 적정조건을 구명하기 위한 insulin (100ng/ml), hydrocortisone (50ng/ml) 및 transferrin (100ng/ml)에 의한 영향이 Figure 1.1 에 나타나 있다. 48시간 동안 지방조직 절편을 배양하는 동안 그리고 지방합성 측정 위한 2시간의 incubation 모두 해당 호르몬을 함유시켰다. 위의 3가지 중 insulin을 첨가하지 않았을 때 지방합성량 감소가 가장 심했고, hydrocortisone 또는 transferrin을 첨가하지 않았을 때도 3가지 모두 첨가한 구에 비해서 지방합성이 다소 감소했다. 그래서 천연물의 지방합성 억제 또는 작용 능력을 구명하는 연구에서는 배양액에 insulin(100ng/ml), hydrocortisone(50ng/ml) 및 transferrin (100ng/ml)을 첨가시켰다. 이렇게 호르몬을 첨가하는 이유는 최대 지방합성을 가져오는 조건을 갖추고 난 뒤에 천연물 등의 지방합성 억제작용을 잘 구명할 수 있기 때문이다.

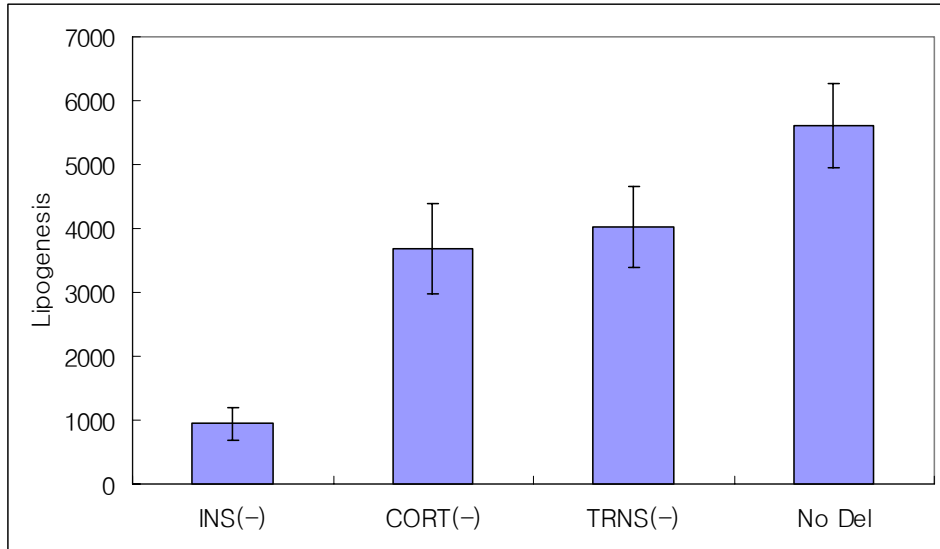


Figure 1.1 Effect of insulin, hydrocortisone and transferrin on lipogenesis of pig adipose tissue. Adipose tissue were cultured for 48hrs with insulin deletion [INS(-)], hydrocortisone deletion [CORT(-)], transferrin deletion [TRNS(-)] or no deletion [No Del] before measurement of lipogenesis. Lipogenesis was expressed as glucose conversion to total lipid per mg tissue per 2hrs.

나) 지방조직 배양시간에 따른 차이

천연물 또는 어떤 약제에 의해 지방합성의 억제 또는 촉진이 일어나기 위해서는 지방합성에 관여하는 효소의 양 (enzyme mass)의 변화 또는 covalent modification이 일어나야 한다. 효소의 양의 변화를 가져오기 위해서는 충분한 기간 동안 지방조직 절편이 특정호르몬 또는 물질에 노출되어야 한다. 그래서 본 연구에서는 지방조직을 24시간 배양, 48시간 배양 및 48시간 배양하면서 24시간에 media 교환 등의 3처리를 두고 비교시험을 했다. Table 1에서 보는 대로 아무 처리를 하지 않은 대조구의 경우 24시간보다는 48시간 지방조직을 CO₂ incubator에서 배양했을 때 지방조직의 지방합성량이

더 높았다. 이에 대한 이유는, 체내의 여러 호르몬이 복합적으로 작용하지 않는 *in vitro culture system*에 지방조직이 적응하는데 시간이 걸리기 때문으로 사료된다. 그리고 48시간 동안 culture하면서 24시간 만에 media를 교환한 구는 교환하지 않은 구에 비해 지방합성량이 더 높지 않았다. 즉 본 연구 system에서는 24시간 만에 신선한 media를 교환해 주지 않아도 지방합성이 잘 일어 날 수 있음을 나타낸다.

성장호르몬 (porcine somatotropin, pST)은 돼지 지방조직의 지방합성을 크게 억제하는 물질로 알려져 있는데 Table 1.1에서 보는 대로 지방조직을 성장호르몬과 48시간 배양했을 때가 24시간 배양했을 때보다 지방합성이 더 크게 억제되었다. 이 사실은 48시간 동안 배양해도 성장호르몬의 지방합성 억제작용이 감소하지 않았음을 나타낸다. 24시간 만에 media와 pST를 교환해서 48시간동안 배양한 구가 이들을 교환하지 않고 48시간 배양한 구에 비해 지방합성억제 능력이 더 높지 않았다. 그래서 대조구와 성장호르몬 투여구의 결과를 종합해 볼 때 24시간 만에 배양액을 교환하지 않고 48시간동안 지방조직을 배양한 후 지방합성을 측정하는 것이 적합하다는 결론을 얻었다. 그래서 본 연구의 주 조사항목인 200여개의 천연물이 지방합성에 미치는 영향은 배양액 교환 없이 48시간동안 지방조직을 천연물과 배양한 후에 지방합성을 조사했다. 천연 면역 활성물질로 알려진 Echinacie를 첨가한 것도 동시에 실험했는데 Table 1.2에 보는 대로 Echinacie는 돼지 지방조직의 지방합성에 영향을 미치지 않는 것이 확인되었고, 배양시간이 미치는 영향은 대조구와 유사하였다. 즉 48시간 배양구가 24시간 배양구에 비해 지방합성량이 많았다.

Table 1.1 Effect of culture time on lipogenesis of pig adipose tissue. Adipose tissues were cultured for 24hrs, 48hrs or 48 hrs with media change at 24hrs. Adipose tissues were cultured with no treatment(control), porcine somatotropin(pST, 10ng/ml) or gense noid(Ech 10ug/ml). Lipogenesis was expressed as p mole glucose conversion to total lipid per mg tissue per 2hrs. change *= culture media was changed after 24hrs culture began.

Treatment	Lipogenesis		
	Culture Time		
	24 hr	48 hr	48 hr + change*
Control	2375.1±432.92	3175.9±381.89	3046.5±172.83
pST	154.5±16.92	114.2±15.09	123.3±17.52
Echinacie	2341.3±193.51	2371.6±357.39	2954.1±392.17

※ Values are mean ± SD

2) 천연물 191종이 지방합성에 미치는 영향

천연물이 지방합성에 미치는 영향은 % control 즉 대조구에 비해 몇 % 내려가느냐 또는 올라가느냐로 표시했는데 그 이유는 돼지로부터 biopsy할 때 마다 지방 조직을 떼어낸 부위 또는 돼지가 받은 stress의 정도에 따라 지방합성(lipogenesis)양이 달라지기 때문에 매 culture시마다 대조구를 뒤서 % control로 표시하는 것이 타당하기 때문이다. 대조구는 culture media에 아무것도 함유하지 않는 것이었다. Table 2에는 191개의 천연물이 돼지 지방 조직의 지방합성에 미치는 영향이 나타나 있다.(특히 문제 때문에 현 단계에서 구체적인 이름을 밝힐 수 없어서 수치로써 물질명을 대신했다). 10개 정도의 천연물이 지방합성을 억제했는데 이것들이 2차년도 of cell culture에서 지방세포의 분화억제를 가져올 수 있는지 기대된다. 천연물 29번의 지방합성 억제가 매우 높았는데 (대조구의 5.9%), 이 천연물은 지방합성만 특이적으로 억제했는지 또는 세포에서 독성으로 작용했는지 의심스럽다. 2차년도 연구에서 이에 대해 밝혀질 것이다. 그래서 돼지 지방조직의 지방합성억제도 가져오고 (대사작용에 영향), 지방세포의 분화의 억제도 가져올 수 있는 물질을 탐색해 낸다면 이것은 인체나 가축에서 지방축적을 억제할 수 있는 가능성이 있는 물질이 될 것이다. 본 연구에서 지방합성을 촉진하는 물질은 찾아내지 못했다. 즉 대조구에 비해 30%이상 지방합성의 촉진을 가져온 물질은 없었다. 지방축적 억제 물질을 찾아내는 것이 주관심사이지만 한편 피하지방은 증가하지 않으면서 근내 지방은 증가시킬 수 있는 천연물질이 발견된다면 이

것은 고급육 생산에 이용될 수 있기 때문에 약간 기대했었는데 찾을 수 없었다.

Table 1.2 Effect of various plant extract on lipogenesis of pig adipose tissue. Adipose tissues were cultured with plant extracts for 48hrs before measurement of lipogenesis. The data were expressed as % control.

천연물	Lipogenesis	천연물	Lipogenesis	천연물	Lipogenesis
control	100	산사	103.4±3.02	도인	85.6±7.12
강활	83.0±1.91	사간	32.5±2.82	천궁	54.8±3.76
우슬	94.8±3.85	오약	62.1±5.62	대복피	110.6±7.52
숙지황	80.0±3.37	조각자	120.8±10.45	하고초	80.8±1.02
구기자	88.5±4.20	자오가근피	112.1±17.73	견지황	90.5±3.14
석창포	91.7±9.50	녹차	97.0±18.08	청피	101.9±11.71
천수근	74.5±6.74	관중	91.0±9.04	선태	82.4±7.41
HK086	91.8±7.14	황련	5.9±0.52	우슬	92.9±9.31
HK086	93.3±4.49	승마	85.2±2.84	백작약	107.2±14.07
HK082	90.8±5.58	두충	95.2±6.97	천수근	81.5±7.29
HK082	93.6±9.76	당선모	94.7±17.20	홍화	90.5±11.09
백두옹	97.6±5.10	백지	88.5±8.85	연자육	85.4±16.24
적작약	92.6±5.53	금은화	110.8±6.49	방기	84.2±3.76
어성초	91.4±12.23	EGCG	90.0±9.13	부자	93.6±3.12
고삼	32.9±2.76	St. Jaohasworit	112.6±6.56	단삼	104.5±6.50
천마	91.3±6.28	삼칠근	103.4±6.69	금은화	85.6±7.63
청피	126.2±19.21	진피	95.0±12.21	방풍	95.1±1.13
원지	62.4±7.06	구척	89.7±2.74	창출	107.3±13.82
상기생	105.2±9.52	현삼	94.5±15.19	감초	96.3±5.12
백강잠	95.3±21.14	오가피	79.0±5.10	천화분	83.8±5.02
인동	105.9±19.49	조각자	79.2±15.68	포공영	107.1±6.36
천화분	55.1±8.05	반하	87.0±2.99	현호색	41.8±1.05

천연물	Lipogenesis	천연물	Lipogenesis	천연물	Lipogenesis
당귀	95.0±11.19	방풍	106.2±12.47	석고	121.2±5.28
천궁	53.4±5.70	원지	99.3±20.46	W4	136.7±13.03
목향	67.5±5.69	강활	29.3±7.15	D6	152.2±12.74
죽여	100.4±8.07	옥활	94.1±12.75	D7	129.0±6.24
창출	87.9±3.94	측백엽	96.1±10.53	D13	115.5±20.33
복신	103.0±5.22	천문동	99.1±8.26	D18	128.7±6.39
현삼	94.9±12.08	방기	112.5±20.60	D30	96.5±8.09
건강	99.0±16.75	자단	132.4±16.53	D31	118.0±7.03
패모	92.2±16.19	오약	103.1±5.39	D32	108.1±0.44
두충	94.4±4.33	승마	113.8±4.65	D101	100.4±9.20
마황	107.5±10.08	시호	92.5±9.45	D102	110.4±5.22
황백	45.8±7.79	전호	58.9±10.16	D103	114.0±12.30
황련	26.8±1.21	현호색	116.7±15.05	D104	104.0±15.59
황금	96.8±8.28	저령	115.1±19.39	D105	51.9±0.71
석창포	93.9±6.03	길경	106.0±4.90	D106	102.5±16.32
봉출	106.6±9.45	맥문동	132.8±17.06	D107	95.3±14.16
목통	104.2±13.92	만산	107.3±14.62	D108	109.1±13.61
신곡	115.5±20.58	용망	99.9±9.52	D109	88.9±5.93
진교	100.8±11.80	삼칠근	125.6±8.24	D110	118.7±7.31
우슬	101.7±8.87	망초	125.2±12.41		

※ Values are mean ± SD

3) 천연물 농도에 따른 차이

앞에서 기술한 대로 191개의 천연물이 돼지 지방조직의 지방합성에 미치는 영향을 규명했는데, 이들 중에서 지방합성을 크게 억제한 5종의 천연물을 선별해서 20ug/ml과 50ug/ml의 두 농도를 두고 농도에 따른 지방합성을 조사했다. Fig 1.2에서 보는 대로 고삼, 사간 및 현호색는 농도가 높을수록 지방합성 억제정도가 더 높았는데 이 사실은 191개의 천연물의 1차 screening 방법이 옳았음을 나타낸다. 그러나 황련은 두 농도 간에 차이가 없었는데 이 물질은 20ug/ml에서 이미 지방합성을 크게 억제했기에 추가적으로 더 크게 억제하기는 어려웠던 것으로 사료된다. 오약은 다른 것과는 달리 두 농도 간에 차이가 없었다.

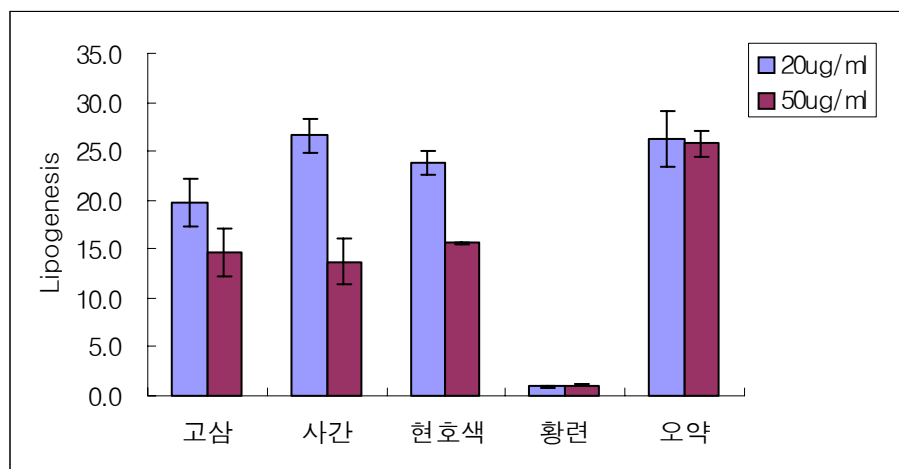


Figure 1.2 Effect of the concentration of plant extracts on lipogenesis of pig adipose tissue. Adipose tissues were treated with plant extracts for 48hrs before measurement of lipogenesis. Lipogenesis was expressed as pmole glucose conversion to total lipid per mg tissue per 24hr.

2. 천연물이 지방세포의 분화에 미치는 영향.

본 세부과제의 주된 연구내용은 160여개의 천연물을 cell line인 3T3-L1 cell과 신생자돈에서 채취한 지방전구세포(stroma-vascular)를 배양 중에 함유시켜 천연물이 이 두 가지 세포의 분화에 미치는 영향을 조사하는 것이다. 세포분화의 정도는 효소인 GPDH(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)의 활성도를 측정함에 의해서 구명했다. 3T3-L1 cell은 미국 ATCC사에서 구입해서 초기에 많이 증식시켜 액체질소에 보관하면서 사용했다. 돼지 지방전구세포는 충북 진천군에 소재한 양돈장에서 생후 2일 이내의 40여 마리의 돼지를 5개월에 걸쳐서 구입해서 세포분리에 이용했다. 대개 체중 2Kg의 돼지에서 5-6g의 지방조직을 떼어내면 약 1×10^8 개의 지방전구세포가 나오는데 이를 6-well plate에 seeding해서 배양했다. 실제로 수행한 연구방법을 아래에 구체적으로 기술했다.

가. 재료 및 방법

1) cell line 3T3-L1 cell의 배양

본 연구에서 이용한 cell line인 지방전구세포는 생쥐에서 유래한 3T3-L1 cell이었는데 미국 ATCC사에서 구입했다. 이 세포는 FBS를 포함한 배지(DMEM)에서 배양하면 confluent할 때까지 증식하고 insulin, dexamethasone 및 isobutylmethylxanthine 으로 분화유도하면 대개 14일 후에 fibroblast에서 cuboidal 모양의 성숙지방세포로 변하게 된다. 본 연구의 궁극적인 목표가 돼지의 지방 축적을 조절(억제)할 수 있는 물질을 찾는 것이기 때문에 돼지에서 채취한 지방전구세포가 좋겠지만 이 경우 실험할 때 마다 돼지를 죽여야 하는 번거로움 때문에 cell line을 이용하는 것이 필요한 경우가 있다. 그러나 돼지에서 채취한 세포의 결과와 유사한지를 비교 검토해야 한다. 본 연구에서 사용한 배양 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

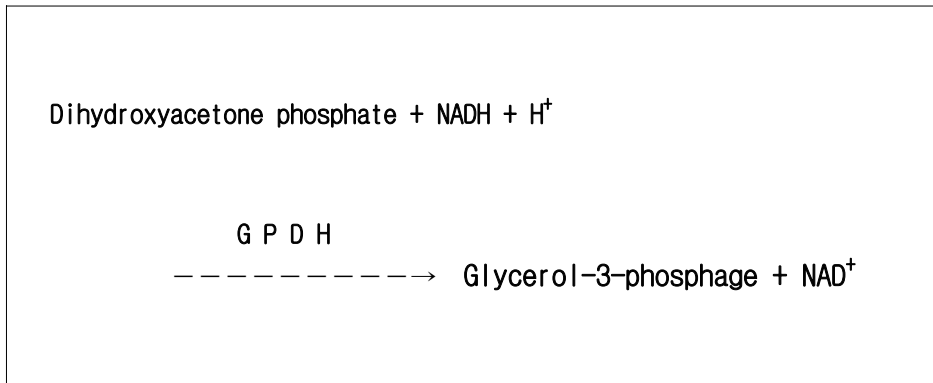
3T3-L1 cell의 배양은 Chen등(1997)의 방법을 약간 변형시켜 수행했다. 분화유도 6일전(day -6)에 3T3-L1 cell을 6-well plate에 1 well 당 3×10^4 cell을 seeding했다. 사용한 media는 10% FBS를 함유한 DMEM이었다. day 0 에 분화유도를 위해서 insulin(1 μ M), dexamethasone(1 μ M) 및 0.5nM

IBMX(isobutylmethylxanthine)을 media에 함유시켜 2일간 배양하고 day 2에는 insulin만 함유시켜 2일 더 배양했다. 분화유도 후 8일 더 배양해서 seeding한지 14일 만에 배양을 종료하고 GPDH를 측정해서 세포의 분화 정도를 구명했다. media는 2일 마다 교체했다.

2) 세포분화측정

3T3-L1 cell의 성숙지방세포로의 분화 정도는 세포의 GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase)를 측정함으로써 구명했다. glycerol-3-phosphate는 중성지방(triglyceride)생성에 필수적인 물질이므로 성숙 지방세포는 중성지방을 합성할 수 있는 능력이 있기 때문에 GPDH의 활성도로 분화 정도를 구명했다. 아래에 구체적으로 GPDH측정방법에 대해 설명하겠지만 GPDH측정에 앞서 항상 배양된 세포 중 성숙지방세포의 양을 육안으로 확인하고 난 뒤 측정된 GPDH과 일치하는지를 점검했다. 본 연구에서 수행한 구체적인 GPDH 측정방법은 아래와 같다.

GPDH 활성도는 cell을 seeding한 후 14일에 시행했다. cell culture가 끝난 후 6-well plate에 있는 media를 완전히 제거하고 PBS로 남아있는 media를 씻어낸 후 270 μ l homogenizing buffer(0.25 M Sucrose, 5 mM Tris base, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT) at pH 7.4) (HB)를 이용하여 6-well plate에서 cell들을 1.2ml eppendorf tube에 수집한 후 가루얼음 위에 꽂아뒀다. 다음으로 10초 동안 6 watts로 cell들을 sonication(Sonics & Materials, Inc.) 시킨 후 4 $^{\circ}$ C 12,000RPM으로 10분 동안 원심분리 했다. tube안의 supernatant를 200 μ l 취해서 새로운 eppendorf에 옮긴 후 assay buffer [Triethanolamine(TEA), β -mercaptoethanol, NADH (β -nicotinamide)] 0.8ml 과 substrate [DAPL(dihydroxyacetone phosphate lithium solution)] 100 μ l 그리고 sample 150 μ l를 1.5ml UV cuvette에 넣고 Parafilm을 이용해 shaking 후 spectrophotometer를 이용해서 340nm에서 흡광도를 이용해 GPDH값을 측정했다. 본 연구에서는 3T3 cell에 있는 GPDH에 의해 기질인 dihydroxyacetone phosphate(DAPL)가 NADH를 얼마나 산화시키는지 측정해서 조사했다. 모든 GPDH 활성도는 단위단백질 무게 당 활성도를 구명했는데, 단백질 측정은 Bradford(1976)방법을 따랐다.



3) 돼지 지방전구세포의 분리 및 배양

본 연구의 최종 목표중의 하나는 천연물 중에서 돼지의 지방축적을 조절 (억제)하는 물질을 찾아내는 것이기 때문에 돼지에서 분리한 지방전구세포 (stroma-vascular)를 이용하는 것이 바람직하기에 갓난 돼지에서 채취한 지방조직에서 지방전구세포를 분리해서 배양했다. 배양방법을 요약해서 설명하면, 생후 2일 이내의 자돈의 등지방을 무균상태에서 잘라내서 collagenase로 소화시켜 위에 Em는 성숙 지방세포를 버리고 바닥에 가라앉은 지방전구세포를 분리해서 6-well plate에 seeding하고 seeding한지 14일 후에 GPDH를 측정함으로써 분화정도를 구명했다. 구체적인 방법은 아래에 기술했다.

돼지 지방전구세포의 분리, 배양은 Suryawan(1997)의 방법을 주로 따르면서 본 연구실에서 변경해서 확립한 방법을 따랐는데 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 생 후 1-2일령 된 체중 2kg 정도의 새끼 돼지를 desicator에서 CO₂ gas를 주입하여 질식사 시킨 후 비눗물로 몸 전체를 씻는다. 그리고 요오드와 알콜로 철저히 씻었다. tray위에 돼지를 올려놓고 clean bench에서 scaple을 이용해 머리 밑에서 견갑골까지 T자 모양으로 자른 후 forcep과 blade로 fat tissue를 취한다. 미리 무게를 측정한 petridish에 지방조직을 옮겨서 지방조직의 무게 당 2000unit collagenase와 3ml KRB buffer와 섞어 0.22um disk filter와 주사기로 filtering해서 curved scissors로 chopping했다.

chopping 한 지방조직을 삼각플라스크에 옮긴 후 40분 동안 shaking water bath에서 incubation했다. 40분 후 250um nylon screen으로 filtering해서 10분 동안 centrifuge 하고 KRB buffer로 disperse한 후 다시 10분 동안 centrifuge 했다. DMEM/F-12을 5ml 넣어 tube 바닥의 cell들을 disperse 한 후 75um nylon screen으로 filter했다. hematocytometer로 cell을 counting 하고 난 뒤 10% FBS를 함유한 DMEM/F-12가 함유된 6 well plate에 1×10^6 cell/well을 seeding했다. seeding 1일후에 RBC 등을 제거하고 난 뒤 insulin(1uM), transferrin(1ug/ml) 및 hydrocorisone(50ng/ml)으로 분화유도 하고 2일마다 media를 교환해줬다. 대개 cell seeding 한 후 14일경이 지나면 지방전구세포가 성숙지방세포로 분화한다. Fig 1.3 은 cell seeding 경과 일수에 따른 돼지 지방전구세포의 분화정도를 잘 보여주고 있다.

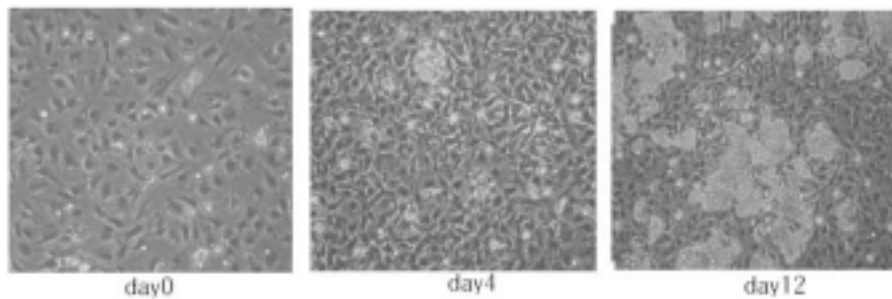


Fig 1.3 Effects of culture time on differentiation of porcine preadipocyte. Cells were induced for differentiation on day 0.

4) 천연물의 처리

두 세포 모두 천연물 처리 농도는 배양액 ml당 20ug 이었으며 4일 동안 배양액에 첨가했다. 3T3-L1 cell의 경우 분화유도일로부터 4일 이었으며, 돼지 지방전구세포의 경우는 cell seeding 1일 후에 RBC등의 제거를 위해 washing 했는데 washing 당일부터 4일간 처리했다 대조구는 같은 부피의 천연물을 녹이는 물 또는 alcohol을 함유시켰다. 각 천연물 마다 4반복을 두었다.

나. 결과 및 고찰

1) 천연물이 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향

이미 연구방법에서 언급한대로 3T3-L1 cell은 mouse에서 유래했지만 세포배양의 편이성 때문에 실험에 많이 이용되는 세포이다. 본 연구에서는 돼지에서 채취한 지방전구세포를 이용하기 전에 먼저 cell line인 3T3-L1 cell을 이용해서 천연물이 이들 세포 분화에 미치는 영향을 구명했다. 천연물이 지방세포의 분화에 미치는 영향은 대조구에 비해 몇 %가 내려가거나 올라가느냐로 표시했는데 그 이유는 세포 배양시마다 세포의 활력이나 계대수에 따라 분화정도가 다르기 때문에 배양 시마다 대조구를 뒤서 대조구에 대한 %로 표시하는 것이 타당하기 때문이다.

Table 1.3 에는 191개의 천연물이 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향이 나타나 있다. 상당수의 천연물이 세포분화를 억제했는데 이중에 일부는 1차 년도에 지방합성을 억제했던 물질이고 나머지는 1차 년도에 지방합성을 억제하지 않았던 물질이다. 이 결과가 갓난 돼지에서 채취한 지방전구세포에서도 비슷하게 나타나는지 궁금하다. 결과가 거의 같게 나올 경우 천연물들의 물질을 테스트할 때 돼지를 죽여야 하는 primary cell보다 cell line인 3T3-L1 cell 이용하는 것이 유리할 것이다.

Table 1.3 Effects of various plant extract on differentiation of 3T3-L1 cells. Cells were treated with 20ugl/ml of extracts for four days after induction. The data were expressed as % control.

천연물#	cell diff.	천연물#	cell diff.	천연물#	cell diff.
control	100	당선모	114.6±9.30	갈근	81.8±1.67
강활	98.4±4.22	백지	85.5±2.93	독활	96.5±13.23
우슬	74.2±3.69	금은화	84.0±6.20	생강	84.7±2.82
속지황	77.2±7.26	EGCG	79.5±6.76	자초	103.8±5.56
구기자	98.0±10.27	St. jaohasworit	106.9±9.59	형개	104.8±5.69
석창포	107.7±10.24	삼칠근	91.2±5.41	육계	114.7±9.01
천수근	107.7±13.73	진피	133.4±4.63	지실	36.6±9.84
HK086	110.4±9.62	구척	126.0±5.40	의이인 (안녹음)	106.5±6.02
HK086	125.1±9.29	현삼	118.9±6.64	도인	88.3±2.37
HK082	99.8±2.15	오가피	115.6±8.01	백강잠	97.2±9.43
HK082	108.2±7.50	조각자	141.8±7.03	마황	86.2±9.80
백두옹	98.8±5.49	반하	137.2±10.54	YRG	78.2±7.37
적작약	118.8±14.35	도인	114.4±10.10	반대해	83.3±3.52
어성초	111.6±10.74	하고초	86.4±0.00	감길탕	77.8±15.84
고삼	135.9±7.16	선태	80.9±7.15	감길탕+	69.9±2.14
천마	105.8±12.46	백작약	79.1±9.98	황기	86.6±6.72
원지	4.2±0.76	감초	76.4±2.09	복령	85.6±1260
상기생	99.8±5.64	천화분	82.9±4.61	감초	72.0±5.41
백강장	91.3±4.07	포공영	83.1±4.71	죽여	62.3±13.61
인동	99.1±7.48	천궁	75.0±8.52	당귀	63.6±5.59
산사	99.4±3.24	YGP	81.0±2.31	애엽	15.4±2.57
조각자	91.8±6.25	형개	74.0±5.02	택사	168.1±17.34
자오가근피	84.1±3.84	강활	83.5±3.92	소목	65.1±6.20
관중	82.8±1021	치자	79.7±4.67	백복령	91.6±5.61
승마	85.4±6.24	지실	69.7±5.73	삼릉	73.2±4.88

Values are mean ± SE

천연물#	cell diff.	천연물#	cell diff.	천연물#	cell diff.
청피	84.2±4.95	목향	74.2±10.75	자단	78.9±3.54
적작약	69.3±7.08	죽여	106.3±6.20	오약	71.6±5.34
감초	76.2±7.98	창출	96.0±3.19	승마	70.3±4.34
숙지황	54.6±7.33	복신	86.0±2.41	시호	98.1±5.37
육계	93.6±6.32	현삼	105.07.47	전호	2.6±0.23
갈근	59.6±4.31	건강	115.0±7.14	현호색	70.5±5.19
황기	79.0±4.12	패모	108.1±8.72	저령	60.3±3.77
소엽	59.7±8.39	두충	101.7±9.02	길경	112.0±18.97
음양곽2	95.2±5.93	마황	86.8±4.65	맥문동	99.8±8.21
죽여	85.1±9.00	황백	79.1±2.41	만산	71.5±3.30
산사	84.1±9.86	황련	8.5±0.64	용망	104.6±6.66
창이자	78.2±7.86	황금	105.4±7.69	삼칠근	101.9±9.64
음양곽3	92.0±6.76	석창포	102.2±2.94	망초	99.2±8.19
목단피	90.2±8.61	봉출	100.8±6.82	석고	110.0±6.62
형개	77.8±7.66	목통	117.4±6.54	D6	69.9±6.43
계지	125.8±15.96	신곡	112.0±3.80	D7	99.2±11.72
백출	103.4±10.83	진피	59.0±3.83	D13	79.2±0.83
왕류행	62.8±18.70	우슬	63.0±3.89	D17	71.3±4.59
후박	106.±59.78	방풍	80.6±1.35	D18	66.2±3.78
아고자	90.1±3.00	원지	65.3±6.35	D30	68.4±4.00
향부자	104.7±15.35	강활	79.9±6.95	D31	73.1±2.85
음양곽1	80.4±4.19	옥활	65.4±4.63	D101	68.9±3.39
박하	47.5±3.63	측백엽	64.6±3.46	D102	74.3±2.29
당귀	107.±86.90	천문동	65.8±2.30	D103	66.4±9.45
천궁	99.7±3.09	방기	62.0±1.94	D104	74.8±1.44

천연물#	cell diff.	천연물#	cell diff.
D105	12.2±1.06	D107	65.6±3.08
D106	74.0±3.36	D108	72.2±3.36

2) 천연물이 돼지 지방전구세포의 분화에 미치는 영향

천연물이 갓난 돼지에서 채취한 지방전구세포의 분화에 미치는 영향이 table 2에 나타나 있다. 상당수의 천연물이 세포분화를 억제했는데 일부는 3T3-L1 cell의 세포분화 억제 정도와 비슷하지만 나머지는 그렇지 않았다. 1차 년도의 돼지 지방조직을 이용한 지방합성 결과와 2차년도의 지방세포분화 결과 중 어느 것이 실제로 돼지에게 급여했을 때 돼지지방축적 억제를 가져 오는데 더 크게 기여할지는 확신하기 어렵다. 돼지를 포함한 모든 포유동물이 과잉의 에너지 섭취에 대응하기 위해서 태어난 뒤에는 끊임없이 세포수의 증가(본 연구의 지방전구세포의 세포분화와 관련)가 일어날 수 있기 때문에 세포분화의 억제가 더 크게 기여할 듯이 여겨지지만 단언할 수는 없다. 돼지의 성장이 진행될수록 지방전구세포의 수가 적어지기 때문에 (본 연구실 미 발표 data) 천연물의 투여 시작 시기가 중요하게 작용할 것이다. 천연물의 투여시기가 비육후기의 돼지의 경우에는 대사 작용과 관련이 큰 지방합성결과가 지방세포분화결과보다 더 중요할 것이기 때문이다. 가장 이상적인 것은 지방합성도 억제하고 지방세포의 분화도 억제하는 천연물을 선택해서 돼지에 급여하는 것이다.

Table 1.4 Effects of various plant extract on differentiation of porcine preadipocyte. Cells were treated with 20ug/ml of extracts for four days after washing. The data were expressed as % control

천연물	세포분화	천연물	세포분화	천연물	세포분화
control	100	황련	98.8±3.45	방풍	96.6±6.68
강활	110.6±6.74	당선모	110.2±6.62	창출	92.6±1.67
우슬	106.6±4.24	EGCG	118.6±10.58	감초	116.3±7.52
숙지황	112.7±5.83	St.Johasw orit	88.6±4.58	천화분	107.6±4.24
구기자	117.3±3.40	삼칠근	110.8±4.29	포공영	121.5±6.13
석창포	129.0±3.29	진피	111.6±3.36	현호색	101.5±7.05
천수근	120.6±6.19	구척	103.4±5.38	천궁	109.0±6.07
HK086	115.6±1.43	현삼	131.0±2.24	YGP	103.7±7.04
HK086	112.1±1.31	오가피	141.8±5.85	형개	77.6±4.78
HK082	122.0±6.14	조각자	113.4±15.52	강활	202.5±11.06
HK082	110.2±3.81	반하	117.9±3.69	치자	126.8±2.07
백두옹	91.9±13.17	도인	126.5±2.60	지실	133.7±2.07
적작약	111.3±4.60	천궁	131.8±14.88	갈근	115.5±8.25
어성초	129.1±2.85	대복피	127.1±12.39	독활	112.0±7.24
고삼	128.6±8.17	하초	122.1±15.12	생강	108.0±8.22
천마	107.6±4.27	건지황	124.3±8.64	자초	113.7±4.35
청피	145.7±5.93	청피	173.1±11.98	형개	125.7±4.77
원지	56.0±5.05	백작약	107.2±1.89	육개	161.0±7.46
상기생	106.9±5.94	천수근	121.5±8.84	지실	100.6±4.64
인동	100.2±41.08	홍화	113.6±26.61	의이인	117.8±4.11
산사	109.7±4.20	연자육	74.1±2.19	도인	117.5±8.40
오약	89.1±3.94	방기	145.2±7.70	백강잠	105.1±8.75
자오가근피	118.9±6.97	부자	103.8±6.88	마황	112.6±3.28
녹차	93.7±8.74	단삼	106.6±2.55	YRG	118.9±3.90
관중	113.7±10.18	금은화	108.8±4.98	반대해	107.8±5.23

Values are mean ± SE

천연물	세포분화	천연물	세포분화	천연물	세포분화
감길탕	111.6±9.78	감초	59.6±4.72	복신	121.2±4.48
감길탕+	87.3±3.61	숙지황	67.7±8.26	현삼	72.1±7.52
황벽	69.8±7.57	육계	69.1±5.69	건강	86.1±19.45
지모	139.3±18.02	갈근	76.6±4.25	폐모	75.4±9.39
창출	87.9±6.86	황기	83.8±5.77	두충	113.5±8.91
황기	84.2±3.49	소엽	67.2±5.70	마황	116.5±14.33
희침	104.8±15.54	음양곽	59.8±5.37	황백	139.7±7.60
복령	111.7±17.71	죽여	67.7±6.64	황련	121.8±6.31
인삼	107.1±9.64	산사	64.1±8.21	황금	128.6±12.35
감초	111.2±6.41	창이자	61.7±8.46	석창포	106.1±5.09
홍경천	99.0±6.57	음양곽	67.7±5.74	봉출	98.7±7.10
마황	63.6±5.32	목단피	57.2±5.40	목통	119.1±6.14
신이	233.3±22.65	형개	59.5±2.04	진교	51.1±1.74
목단피	281.9±6.12	계지	69.6±0.60	우슬	45.9±5.42
죽려	233.5±22.41	백출	54.1±2.90	방풍	81.2±4.52
당귀	220.6±8.34	후박	7.9±2.19	원지	58.3±4.68
진피	119.9±13.34	아교주	53.5±3.24	옥활	125.5±9.55
맥아	88.6±11.15	백작약	50.47±3.93	축백엽	97.5±13.28
애엽	116.6±4.89	향부자	59.5±5.92	친문동	56.2±3.99
택사	90.8±4.78	음양곽	97.4±14.58	방기	87.2±1.35
인삼	108.2±16.43	박하	97.7±11.47	자단	80.2±3.61
소목	110.8±11.80	당귀	129.8±3.60	오얏	98.5±3.30
백복령	125.4±18.25	천궁	121.3±5.33	승화	82.6±5.77
삼릉	112.7±18.39	목향	233.2±9.82	시호	103.3±11.14
청피	151.6±19.86	죽여	125.5±6.27	전호	2.9±0.44
적작약	70.0±6.38	창출	119.5±4.07	현호색	78.7±8.71

천연물	세포분화	천연물	세포분화	천연물	세포분화
저령	101.1±3.97	D6	92.6±6.09	D102	73.7±5.76
질경	135.0±9.79	D7	110.2±4.27	D103	91.5±2.57
맹문동	115.7±21.40	D13	1016±12.22	D104	87.6±4.96
만삼	113.9±11.62	D17	90.7±8.97	D106	73.9±10.22
용담	124.25±14.98	D18	98.2±12.36	D107	107.6±6.50
삼칠근	136.9±7.27	D31	107.5±6.77	D108	77.4±3.90
망초	126.0±9.16	D32	86.3±8.69	D109	123.9±7.94
석고	110.2±4.19	D101	106.3±4.00	D110	171.2±6.80

3) 천연물의 농도가 세포분화에 미치는 영향

앞에서는 단일농도로 160여종의 천연물이 세포분화에 미치는 영향을 구명했는데, 과연 이들의 작용이 specific한 작용인지를 구명하기 위해서 배양액 1ml당 단위 농도에서 세포분화 억제작용을 나타낸 천연물 40ug/ml 또는 80ug/ml를 첨가해서 농도에 따른 차이를 구명했다. Fig 1.4는 3T3-L1 cell에서 측정된 것인데 천연물의 농도가 높을수록 세포분화 억제작용이 더 컸다. 이 사실은 본 연구의 세포분화측정방법이 적합하고 또 천연물의 분화억제작용이 specific함을 나타낸다. 돼지 지방전구세포로 측정된 결과는 다음과 같다. 천연물 우슬은 고농도(80ug/ml)이 저농도 (40ug/ml)에 비해 58% 세포분화를 억제시켰고, 천궁은 57% 억제 시켰다.

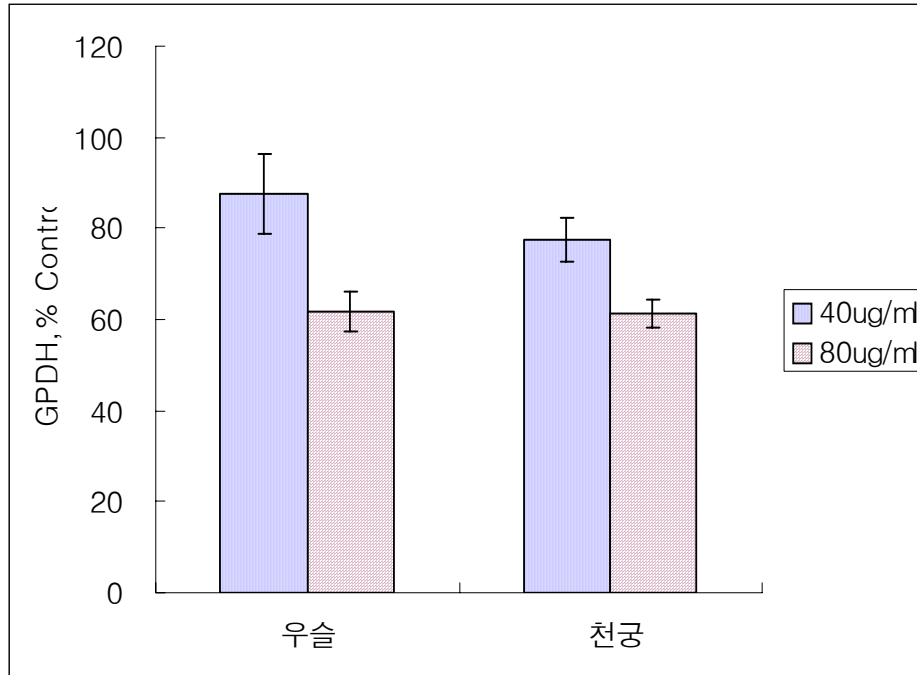


Fig 1.4 The effect of concentration of plant extract on GPDH activity of cultured 3T3-L1 cells. Cells were treated with three plant extracts (#51,54,66) which inhibited cell differentiation in the previous study for two days after induction. Each culture well contained 40ug or 80ug plant extract per 1ml of DMEM.

4) 복분자와 홍화의 농도별 차이

복분자와 홍화가 면역세포의 활성을 가져왔고 또 이들이 지방세포의 분화에도 영향을 미쳤는데 돼지 사양실험에 이용할 가능성을 염두에 두고 투여농도가 세포분화에 미치는 영향을 조사하였다.

복분자와 홍화의 투여 농도가 돼지 지방전구세포의 세포증식 (proliferation)에 미치는 결과가 Fig 1. 5 에 나타나 있는데 250ug/ml 처리가 100ug/ml 처리에 비해서 복분자의 세포증식 억제, 홍화의 세포증식 촉진 작용이 더 컸다. 한편 이 두 물질이 지방세포 cell line인 3T3-L1의 증식에 미

치는 영향이 Fig 1. 6 에 나타나 있는데 복분자의 세포증식 억제 작용은 돼지 지방전구세포에서 보다 더 컸고 홍화의 세포증식 촉진 작용은 더 작았다. primary cell과 cell line과 차이점이 나타났다고 볼 수 있다. 여기서 언급할 사항은 대부분의 식물 추출물이 세포의 증식을 억제하는데 반해 홍화는 촉진했다는 사실이다. 홍화가 어떤 유전자에 작용해서 세포의 증식을 촉진하는지가 궁금하다. 세포의 증식단계에서 미친 영향이 지방 세포의 분화에도 나타났다는데 Fig 1. 7 에서 보는 대로 복분자는 대조구 (복분자와 홍화를 녹이는 용매 처리)에 비해 분화를 억제시켰고, 홍화는 촉진시켰다.

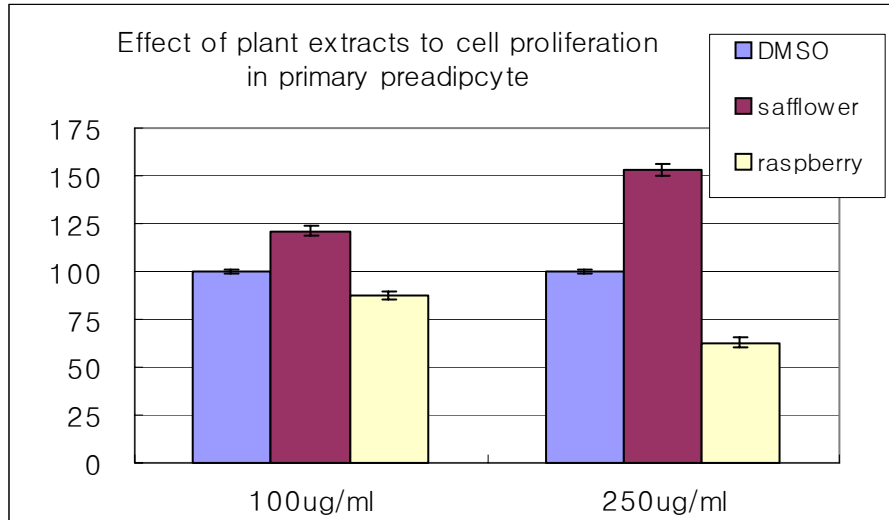


Fig 1.5 Effect of concentrations of plant extract on proliferation of pig preadipocyte. Plant extracts were treated for the first 4 days of culture.

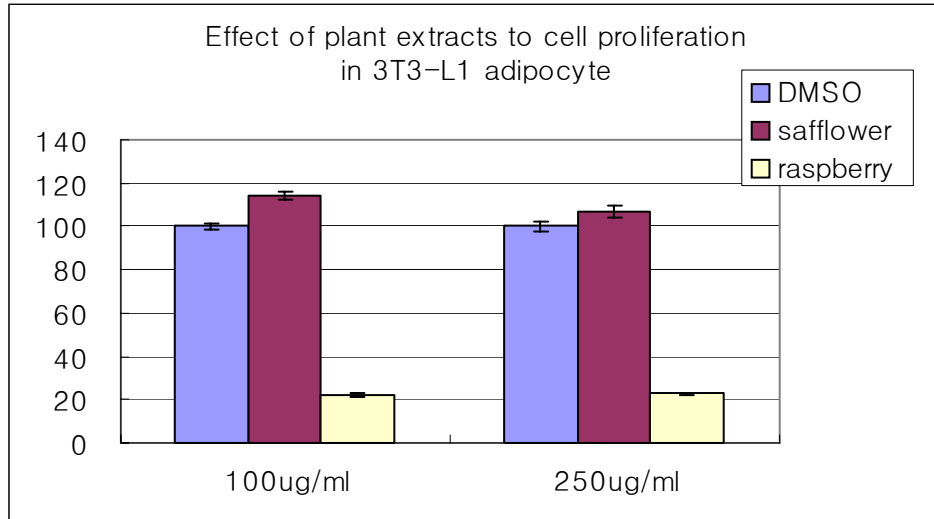


Fig 1.6. Effect of concentraions of plant extracts on proliferaton of 3T3-L1 adipocytes. Plant extracts were treated for the first 4 days of culture.



DMSO

Raspberry 250ug/ml

Safflower 250ug/ml

Fig 3. Photomicrograph of showing differentiation of porcine preadipocytes. 250 ug/ml of raspberry and safflower were treated for the first 4 days of culture. Raspberry decreased differentiation, whereas safflower increased differentiation.

2절 천연물이 면역세포의 기능에 미치는 영향 (in vitro)

1) 천연물의 분리 및 보관

앞에서 기술한 연구방법에 의해 추출한 236종의 천연물은 경희대학교 동서신장병연구소 냉동고 보관중이며 데이터베이스화 했다. 이 천연물의 고유번호는 특허출원 후 공개 할 예정이다.



Fig2.1 천연물 추출 방법

2) 천연물이 돼지의 면역활성 증강에 미치는 영향

(1) ConA와 Echinacea가 세포증식에 미치는 효과

ConA(Concanavalin A: coA란 당에 대한 특이성을 가지는 lectin의 한 종류)와 Echinacie는 면역활성 물질로 잘 알려진 물질이며 면역세포를 증식시키는 성질을 보이고 있다. 본 과제에서는 대표적인 면역 활성 물질로서 이용하고 있다. 농도에 따른 효과와 면역세포 활성화 어떤 변화를 주고 있는지 보았다. (Fig4) ConA와 Echinacie는 면역 활성 물질로 알려진 물질로서, ConA는 Control로 많이 이용되는 물질이며 Echinacie는 최근에 개발된 천연면역활성 물질로 감기약으로 시판되고 있는 물질이기도 하며 여러 가지 활성 기능을 갖고 있음이 알려져 있고 본 연구팀에서도 많은 연구를 해왔던 물질이다. 본 과제에서는 탐색 방법을 개발함에 있어서, Echinacie를 이용하여 천연물 탐색의 control로 이용하였다. Echinacie와 CoA는 0.08 ug/ml농도에서 좋은 활성도를 보여 주었다.

농도 (ug/ml)	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3	0.15	0.08	0.04	0.02	0.01
ConA	0.87	0.90	0.97	0.84	0.87	0.89	1.21	0.69	1.61	1.36	0.85	1.30
농도 (ug/ml)	200	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.8	0.4	0.2	0.1
Echinacie	0.79	0.97	0.74	1.08	0.96	1.17	1.13	0.91	1.60	1.32	0.76	1.23

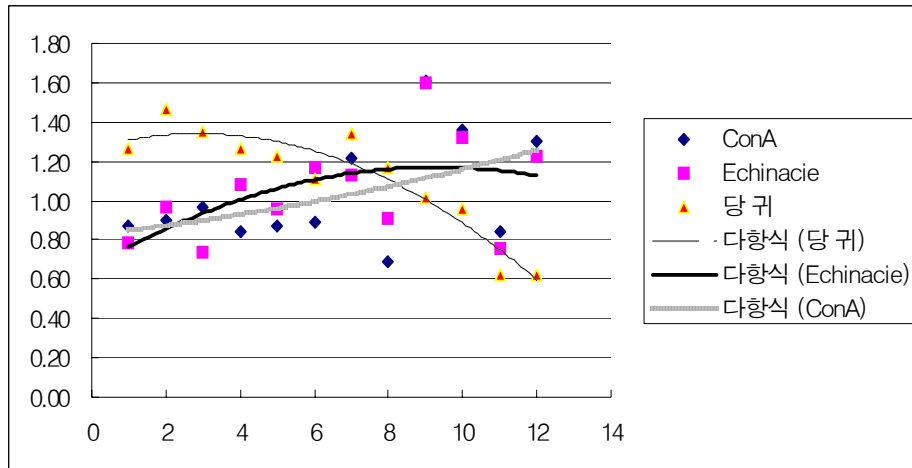


Fig. 2.2 Effect of ConA, Echinacie for Pig lymphocytes

(2) 인삼 성분이 면역활성에 미치는 효과

인삼은 여러 가지 기능을 갖고 있으며 그 중에서도 면역활성을 유도하는 천연물로 알려져 있다, 인삼에는 여러 가지의 Gincenoside가 존재하는데 그 중에서도 Rb1, Rg1, Re, Rd가 잘 알려져 있으며, 이들에 대한 최적농도를 알아 보기위한 면역학적인 활성을 측정하였다. 인삼역시 면역활성물질의 대표적인 물질로서 본과제의 연구에 이용하였다. Rb1은 1.6 ug/ml, Rg1은 2.9 ug/ml, Re는 1.1 ug/ml, Rd는 0.6 ug/ml에서 좋은 효과를 보여 주었다. (Fig. 5) 인삼과 Ecinacea를 이용하여 차후 DNA chip 실험을 통해 표준결과를 만들 계획이다.

$\mu\text{g}/\text{ml}$	10	5.25	2.875	1.688	1.094	0.797	0.648
Rb ₁	0.180	0.231	0.271	0.267	0.257	0.258	0.262
$\mu\text{g}/\text{ml}$	10	5.25	2.875	1.688	1.094	0.797	0.648
Rg ₁	0.185	0.266	0.300	0.289	0.290	0.269	0.225
$\mu\text{g}/\text{ml}$	10	5.25	2.875	1.688	1.094	0.797	0.648
Re	0.202	0.316	0.335	0.342	0.355	0.297	0.264
$\mu\text{g}/\text{ml}$	1	0.750	0.625	0.563	0.531	0.516	0.508
Rd	0.202	0.249	0.267	0.284	0.276	0.260	0.260

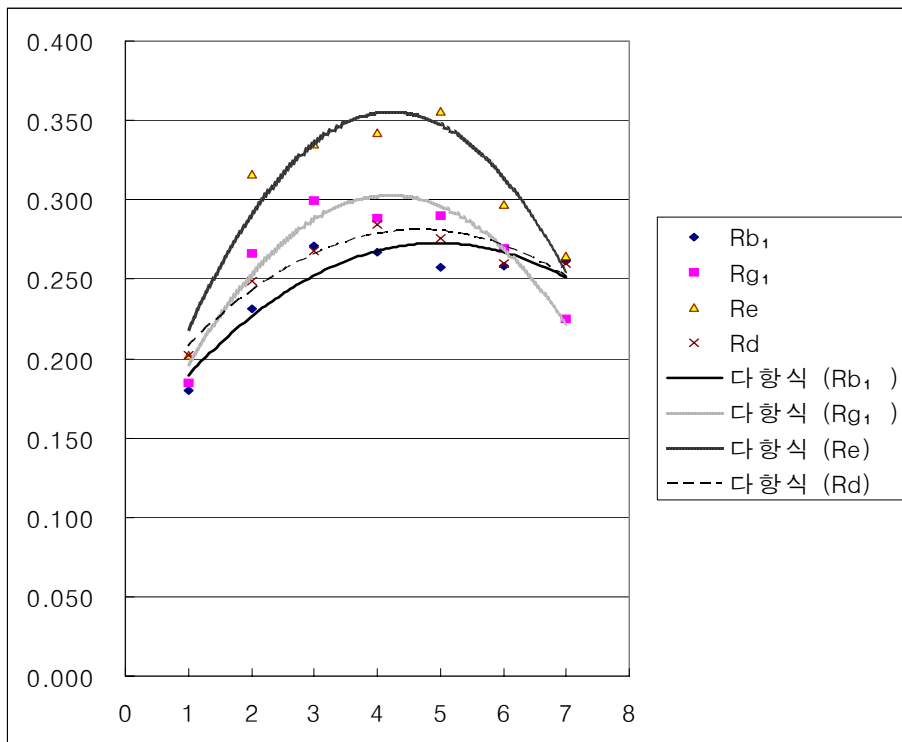


Fig.2.3 Effect of gincenoside for pig lymphocytes

(3) 각종 천연자원식물이 세포면역 활성화에 미치는 효과

천연물이 추출방법과 농도에 따른 효과를 살펴보았다. 천연물을 에탄올과 물로 추출하였을 때와 또한 농도를 달리 처리하였을 때 세포활성도를 측정한 결과이다. Table 2.1에서 보는 대로 일부 추출물들이 매우 좋은 면역 활성을 보이는 것들이 있으며 control로 사용한 Echinacie 정도로 나타나기도 하고 그 이상인 것들(B-6, A-34, A-5, B-33, B-9, B-26, 마황, B-16, 후박, B-30, 의이인)이 있다. 또한 추출방법에 따라 효과가 다른 것을 알 수 있었으며 농도에 따라서도 어느 정도 차이가 있음을 알 수 있었다.

Table 2.1 Effect of various plant extract on immune cell proliferation of pig lymphocytes

번호	한약	EtOH 40	EtOH 10	DW 40	DW 10
84	B-6	2.70	2.77	2.56	2.67
72	A-34	2.60	0.17	0.16	0.43
43	A-5	1.73	0.23	0.26	0.33
91	B-33	1.54	0.39	3.04	4.00
85	B-9	1.52	3.62	0.85	1.49
88	B-26	0.57	0.70	0.48	0.72
75	마황	0.56	0.23	0.41	0.70
86	B-16	0.43	0.47	0.16	3.65
27	후박	0.40	0.13	0.10	0.59
90	B-30	0.40	0.50	1.35	0.63
74	의이인	0.32	0.24	0.33	0.41
92	Echinacea	0.30	0.34	0.23	0.70
11	감초	0.27	0.10	0.15	0.46
83	갈근	0.26	0.15	0.25	0.45
78	현호색	0.25	0.16	0.14	0.51
77	가미순기산	0.20	0.20	0.19	0.57
22	목단피	0.17	0.13	0.21	0.98
80	굴피	0.16	0.16	0.16	0.38
81	보심견비탕	0.16	0.20	0.21	0.48
94	ConA	0.15	0.86	0.39	0.96
3	매엽	0.15	0.12	0.27	0.30
19	산사	0.14	0.13	0.30	0.57
89	B-29	0.14	0.40	0.14	0.75
94	ConA	0.14	1.86	0.39	1.06
63	A-25	0.13	0.14	0.07	0.51

번호	한약	EtO H40	EtOH 10	DW 40	DW 10
17	음양곽2	0.13	0.12	0.16	0.54
76	자초	0.13	0.16	0.15	0.57
21	음양곽3	0.12	0.14	0.23	0.55
60	A-22	0.12	0.18	0.15	2.25
31	음양곽1	0.12	0.12	0.16	0.73
29	백작약	0.11	0.12	0.10	0.58
33	당귀	0.11	0.09	0.14	0.56
46	A-8	0.11	0.10	0.11	0.43
6	소목	0.11	0.13	0.23	0.21
14	갈근	0.11	0.14	0.17	0.49
44	A-6	0.11	0.12	0.10	0.41
55	A-17	0.10	0.11	0.11	0.54
35	목향	0.10	0.08	0.11	2.43
87	B-24	0.10	0.47	0.12	0.58
96	ETOH	0.10	0.33	0.08	0.42
57	A-19	0.09	0.10	0.24	0.78
13	육계	0.09	0.18	0.09	0.35
59	A-21	0.08	0.08	0.17	0.57
34	천궁	0.08	0.10	0.17	0.52
26	왕불유행	0.08	0.13	0.06	0.24
51	A-13	0.08	0.12	0.09	0.51
39	A-1	0.08	0.12	0.13	0.46
54	A-16	0.08	0.13	0.07	0.56
56	A-18	0.08	0.10	0.12	0.52

EtOH 40: 에탄올 추출물 40 ug/ml 농도로 사용

EtOH 10: 에탄올 추출물 10 ug/ml 농도로 사용

DW 40 : 물 추출물 40 ug/ml 농도로 사용

DW 10: 물 추출물 10 ug/ml 농도로 사용

(4) 천연물 탐색에 있어서 면역세포의 농도에 따른 영향

천연물의 농도를 고정시키고 면역세포의 농도를 변화시킬 때 세포농도의 영향을 살펴보았다. Table 4를 살펴볼 때 control로 사용한 Echinacie와 ConA를 기준으로 천연물을 선별하였다. B-34, B-8, 음양곽, B-27, A-5, 마황, B-26, 형제, 매엽, 음양곽1, 음양곽2, 백작약, B-23, 갈근, A-24, A-19, 죽여, 소목, 참이차, A-22, 의이인, 박하, 후박, 갈근, A-21, B-16, B-22, 목단피, 현호색, B-13, 산사, B-20, 천수근, B-12, A-8, B-11, B-17, 육종형, B-25, 가미순기산, 소엽 등을 선별할 수 있었다. 세포 농도에 따라 다소 차이가 있었으나 큰 차이를 보이지는 않았으며 일부 천연물은 다시 반복하여 확인할 계획이다. 에탄올로 추출한 천연물에서는 다음과 같은 것들이 효과를 보여 주었다. A-5, 음양곽1, 후박, 백작약, 음양곽3, A-8, 갈근, 목단피, 감초, 마황, A-22, 갈근, 천수근, A-4, 현호색, A-15, A-11, 적작약, B-33, 차기버섯, A-19, B-11, 육계, 가미순기산, 의이인 등의 물질이 ConA보다 면역세포 증식을 활성화하는 것으로 보였다. 일부 물 추출천연물과 일치하는 부분도 있으나 차이가 나는 것들도 있어서 이들은 추출 방법에 따른 차이로 생각이 되며, 개별적으로 하나씩 정밀 분석을 할 계획이다. 선별한 천연물에 대해 IL-2, IL-12, IFN-gamma등의 발현효과가 있는지 조사하고 있는 중이다.

Table 2.2 Effect of various plant extract on immune cell proliferation of pig lymphocytes at various cell concentration

번호	천연물	DW 7.5x10 ⁶ /ml	DW 2.5x10 ⁶ /ml	EtOH 7.5x10 ⁶ /ml	EtOH 2.5x10 ⁶ /ml
107	B-34	1.84	1.65	1.08	1.15
81	B-8	1.39	1.29	0.77	0.52
138	Echinacea#1	0.78	0.95	0.38	0.31
21	음양곽3	0.75	0.62	0.39	0.32
100	B-27	0.74	0.68	0.78	0.54
43	A-5	0.74	0.68	0.43	0.42
111	마황	0.68	0.66	0.31	0.28
99	B-26	0.68	0.67	0.66	0.67
23	형제	0.64	0.59	0.21	0.15
3	매엽	0.63	0.92	0.22	0.22
31	음양곽1	0.60	0.57	0.43	0.36
17	음양곽2	0.60	0.53	0.33	0.31
29	백작약	0.58	0.50	0.42	0.36
96	B-23	0.55	0.50	0.21	0.17
119	갈근	0.53	0.57	0.27	0.30
62	A-24	0.52	0.42	0.21	0.19
57	A-19	0.49	0.45	0.25	0.21
18	죽여	0.46	0.13	0.20	0.14
6	소목	0.46	0.53	0.51	0.46
20	참이차	0.44	0.50	0.19	0.16
60	A-22	0.43	0.37	0.27	0.22
110	의이인	0.43	0.37	0.24	0.22
32	박하	0.42	0.39	0.24	0.20
27	후박	0.41	0.36	0.43	0.27

번호	천연물	DW 7.5x10 ⁶ /ml	DW 2.5x10 ⁶ /ml	EtOH 7.5x10 ⁶ /ml	EtOH 2.5x10 ⁶ /ml
14	갈근	0.40	0.34	0.36	0.32
59	A-21	0.40	0.35	0.19	0.16
89	B-16	0.37	0.33	0.20	1.26
95	B-22	0.37	0.37	0.21	0.18
22	목단피	0.37	0.32	0.35	0.27
86	B-13	0.36	0.32	0.21	0.17
19	산사	0.36	0.32	0.24	0.22
93	B-20	0.35	0.29	0.20	0.15
132	천수근	0.34	0.35	0.27	0.27
85	B-12	0.34	0.28	0.19	0.16
46	A-8	0.33	0.33	0.38	0.37
84	B-11	0.32	0.30	0.25	1.63
90	B-17	0.32	0.29	0.24	0.20
120	육종형	0.31	0.30	0.22	0.24
113	가마순기산	0.31	0.29	0.25	0.21
16	소엽	0.31	0.22	0.20	0.14
140	Con A#1	0.30	0.28	0.24	0.18
112	차초	0.30	0.27	0.23	0.19
49	A-11	0.30	0.22	0.25	0.19
44	A-6	0.29	0.26	0.23	0.18
55	A-17	0.29	0.25	0.17	0.15
56	A-18	0.29	0.22	0.15	0.14
40	A-2	0.29	0.15	0.18	0.15
94	B-21	0.29	0.25	0.17	0.14
10	적작약	0.29	0.26	0.25	0.22
106	B-33	0.28	0.25	0.25	0.17
63	A-25	0.28	0.20	0.23	0.16

3) 지방축적과 면역 관련 유전자 선별

(1) 유전자 프라이머 디자인

지방축적 및 면역관련 유전자를 선정하여 여기에 맞는 primer를 DNASTAR 프로그램을 이용하여 디자인하고 합성하여 유전자를 얻었다. 계속적으로 관련유전자를 선정하여 유전자를 확보하고 있다. 돼지의 지방, 간, 근육조직조직으로 RNA를 추출하고 RT-PCR을 통하여 클로닝하였다. (Fig. 2.4)

Table 2.3. 돼지의 지방 축적 및 면역관련 유전자 선정 PCR primer 디자인

Gene full name	Gene name	Sence	Antisence	bp
Growth stimulating factor	GSF	GGGGGACTCCAGGG AACAACAAAC	ACGCGGTCTGAGGT GCCAAACA	481
Heparin binding epidermal growth factor like protein	HBEG FLP	GAGGGGGCTGGCGG ATGGA	ACGAGCAGACAGAC GGACGACAGC	441
Insulin like growth factor 2	ILGF2	TGGCCGGCCGGACA CTGGAC	CACGGCTGCGGCGG TTCACG	554
Keratinocyte growth factor	KGF	GTTCAGCCCTGAG CGACATAC	GGCAACAAACATTT CTCCTCCACT	382
Mannose 6 phosphate/insulin like growth factor 2 receptor	M6P/I GF2R	CGCCGCCGTGTGCC AGGTGAAA	ATAGGGCGTGCCGT CGTGGTAGTT	1012
Acidid fibroblast growt factor intracellular binding proein	AFGF BP	CCTCTGGCTGGACG GTTATT	AGGAGGAAGTGTTG CTGGATGT	305
Growth potentiating factor	GPF	GAAGTGGCTGAATG GCGAGGACAC	AGGACGACCAGCTG CTTTTTGAG	318
Neurotrophin 3 precursor	N3P	GATTTTCCGCGACA AGGCACAC	GGCGCGGCGGAAGA GGTA	364
Vascular endothelial growth factor receptor	VEGF R	GCGCCCTCTTTTTCAG CATTTTTTACA	CGTGCAAGGAACCT CGGACAAGT	360
Mast/stem cell growth factor receptor	M/SC GFR	TCATCGGCTCTGTC TCCACTGCTC	ACCCGCTGCGATCA CAAAACCAAT	1054
Transforming growth factor beta precursor	TGFB P	CCGCTGCTGCTGCC GCTGCTGTG	ACGCGCCCGGGTTG TGCTGGTTGT	1024
Hepatocyte growth factor activator inhibitor type2	HGFA IT2	CCCGGGTGTTCAG TTCTTC	GCATACGCTTCTCC ACCTCA	285
Growht arrest and DNA damage inducible protein	GADD 45	ACAACGCGGCGCAA AAGATG	TTCTGACACCCGC ACGATA	255
Latent transforming growth factor Binding protein 4s	LTGF bBP4S	TCCGGAGCCGCTGT GTCAAAGTAG	GGAGCGGATGCCAG GATGTG	442
Calcyclin(prolactin receptor associatd protein)	PRA	GTCTGCCCTCTTCC TCCCCTTCAA	ATCCTGCAGCTTCG CCCAATG	215
Placental growth factor precursor	PGFP	CGCGGGCCAGCTAC GAGAGGA	CGCAGCAGGGAGAC GCAGGAC	558
Growth factor independence-1b	GFI1B	CCCCGCGACCAGGA GGAT	TGGGGGTGAGTCGG AAGATG	249
Similar to hepatoma derived growth factor releated protein	SHDG FRP	GGTGCCACATTGA AAAA	TCCTGTCTCTTGG GCTCTC	297
Lens epithelium devided growth factor	LEDG F	AAAAGCCAGCAATG AGGAT	AGATGCTGCTGCTG TTGTC	136

Gene full name	Gene name	Sence	Antisence	bp
Growth/differentiation factor7	GDF7	ATCATTGCGCCGCT GGACTACGAG	AATGGGGCAATGGT GATGTTTAC	532
Growth and transformation dependent protein	GTDP	CCTTTCTTGGGGAC TAACCT	TTTTTGAAGCGACC TGAC	274
Transforming growth factor beta induceing protein	TGF-Bip	CTGGCCTCGGCTCT CATCTC	CCGTATCGCCCCCTC TTGT	274
Connedtive tissue growth factor	CTGF	CGCCGACGACCCACC GCCTTCAGT	TTGCCCTTCTTAAT GTTCTCTTCC	929
Growth hormone secetagogue receptor type16	GHSRT16	AACCGGGGCCCAAC CTCACG	CGCAGCGGGAAGCA GATGG	424
Growth hormone secetagogue receptor type 1a	GHSRT1a	GCATGGCCTTCTCC GACCTACTCA	AACACCGCCACCCG ATACTTCTTG	754
Keratinocyte growth factor receptor short isoform	KGFRSI	GCCGCTTCATCTGC CTGGTTGT	GCCCCGATTTTGCTG CCGTTCTTT	549
Keratinocyte growth factor receptor k-sam isoform	KGFRKSI M	CACCGATGGCTCAG AGGATTTTGT	GCCCCGATTTTGCTG CCGTTCTT	500
Keratinocyte growth factor receptor	KGFR	GCCGCTTCATCTGC CTGGTTGT	GCCCCGATTTTGCTG CCGTTCTTT	894
Transforming growth factor beta type 3 receptor	TGFbT3R	CGGCCGCCCCAGG AGAAGGAG	CTGGGCGGGCGCTA GAAAGAGGT	1150
Nerve growth factor b	NGF b	GCGCCGCTCCTTC AACAG	GGAGGGGCGCAGGA GAGTG	459
Fibroblast growth factor 9	FGF9	GCCGAGGCTTCTGA TGG	TGCCGTTTAGTCCT CGTTCC	555
Growth arrest homeobox transcription factor	GAX	GCTATGGAACACCC GCTCTTTG	CCTCTTGCCCCCGCT TCTCTTCTC	501
Growth differentiation factor 9B	GDF9B	TGGCATCATTTTGG CTTGTG	GTCGGCTGAACGCT GGTA	288
Vascular endothelial growth factor	VEGF	CATCTTCAAGCCGT CCTGTG	TTGCCCTTTCCCT TTCCTC	241
Plakogbobin	plakoglobi n	GCCCTGCCCCGAGCT CACCAAAC	GGACGAGGCGGGGG ATGACAGATG	1159
Beta-catenin	B-catenin	GCTGATCATTCTGG CTAGTGGTGGAC	CCTCAGACATTCTGG AACAAAACAGC	1058
VE cadherin	VE cadherin	TGAGCCCCAAAACC GGAAAACCAA	CTCGCCCGCCCTC CTCATCGTA	1105
Transforming growth factor beta 1	TGFB1	CGCTGCTGCTGCCG CTGCTGTG	GACGCGCCCGGGTT GTGCTGGTT	1024

Gene full name	Gene name	Sence	Antisence	bp
Retinoic acid receptor alfa	RAR-a	CGACCGGAACAAGA AGAAGAAGGA	GGCAGAGGGCGGGG AAGGTC	131
Vascular endothelial growth factor	ILGF1RP	GGCAGTACAACCCC AAGATGAGG	AGCGGCAGGGAGGA CGAGGAG	202
Insulin like growth factor 1 receptor precursor	IGFBP-3	CCGAGGAGGACCGC AGTGTAG	ATCGTGTCTTGGC AGTCTTTTGT	527
Insulin like growth factor binding protein3	MT3	GCTCCAGCGGCAGT CCTCTCG	TTCGGCCCCCTCTCC ACCTTTAC	197
Metallothionein 3	SARP	CCTGCAGAAGATTG GAAAAGACAC	TGGTACAGCGCACA CTCACAAA	104
Steroidogenic acute regulatory protein	TGFB2	GCGAGCGCAGCGAC GAGGAATACT	GGACACGCAGCAAG GGGAAAGCAGA	875
Transforming growth factor beta 2	IGF2	GTGCGGCGGGGAGC TGGTGGACA	CCGATGGAAGGGGC CGAGGAGAG	634
Insulin like growth factor 2	TGF-b	CCGCTGCTGCTGCC GCTGCTGTG	ACGCGCCCGGGTTG TGCTGGTTGT	1024
Transforming growth factor beta	TGFb-3	GTGCACGGGAGAG GGGAGACGAC	AGGAGCAGGCAGGC AGGCAGTGG	1047
Transforming growth factor beta 3	GHR	GAGAGTTCATCCAG GCCTAGAGACAAA	GTAGCAGGGGCAGC ATCATTAGAAGGT	1218
Growth hormone receptor	inhibin beta(b)	GGTCACGGCCCTGC GCAAACACTACA	CCACCCAGCGGCAA GACCACACC	988
Fragment for inhibin beta(b)	inhibin beta(a)	TTTTGTGTGGCGAGT TGCTGGATTA	GCCCGACGTGCCCCG TATGT	1058
Inhibin beta (a)	inhibin alfa	GTATTCCGGCCGTC CCAGCACAC	CCAGGCGGAGAGGC GGAAGGAA	853
Mature porcine factor IX	HPFIX	AGTGCGAGCCCAAT CCA	GGTGCAAGTCGGTA TCCAGT	208
Growth hormone releasing hormone receptor	GHRHR	GTGCCCTGGAGCT GCTGACTGAT	GGAGGGACGCGAGA AGGAAAGAGA	1171
P-selection	P-selection	CTCATCCGCCCCCGC AGTGT	GGAAGGGGAGTGG GTAGAGTTGG	1405
E-selection	E-selection	GGGCTCCAGGTGAA CCAAATAATA	AAGTAGGCAGCATC CCAGACCAGT	966
Transforming growth factor-beta type 3 receptor	TGFb3 R	CGGCCGGCCCCAGG AGAAGGAG	CTGGGCGGGCGCTA GAAAGAGGT	1150
C-kit ligand	c-kit ligand	AAGGGATCTGCAGG AACCGTGTG	GTGGAGGCTGGAGT CTTCAATGGA	569
Diacylglycerol acyltransferase	DGAT	TCGCGGCCGCAGAA GAGGAG	ACACAGCCGCGTTG CCGTAGTT	1296
Cyclin D2	Cyclin D2	GTTTGAAGGGGGAG GGCAGGCAGAG	ACGGCGGGTACATG GCGAACTTGA	833

(2) PCR을 이용한 돼지유전자 확보

돼지 조직에서 추출한 total RNA로부터 역전사효소(reverse transcriptase)를 넣어 cDNA를 만든후, 관련r 유전자의 염기서열을 참고로 하여 제작한 primer(Table 2.4)를 가지고 PCR을 시행하여 각각의 유전자의 cDNA의 일부분을 대량으로 증폭하였다. Total RNA 1ug에 oligo dT primer를 1ul 넣어 72℃에서 10분간 반응시킨 후에, AMV 역전사효소 1ul, RNasin 1ul, 2.5mM dNTP 5ul, 5×reaction buffer 5ul, 및 탈이온수를 첨가하여 총 용량을 50ul로 하여 42℃에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성하였다. PCR은 template로 회석한 cDNA를 2ul, Taq polymerase 2unit, 2.5mM dNTP 3ul, sense primer 10pmole 1ul, antisense primer 10pmole 1ul, 10×reaction buffer 5ul 및 탈이온수를 첨가하여 총50ul의 volume으로 시행하였다. 반응온도를 94℃에서 5min 1회 94℃에서 30sec, 각 primer의 annealing 조건에서 45sec, 72℃에서 1min 씩 35회 반응시켜 2% 한천 gel에서 전기 영동하였다. 각각의 primer는 Genbank에 등록된 염기서열을 참고하여 제작하였으며, 각 primer의 염기 서열 및 증폭된 유전자의 크기는 Table 2.4과 같다.

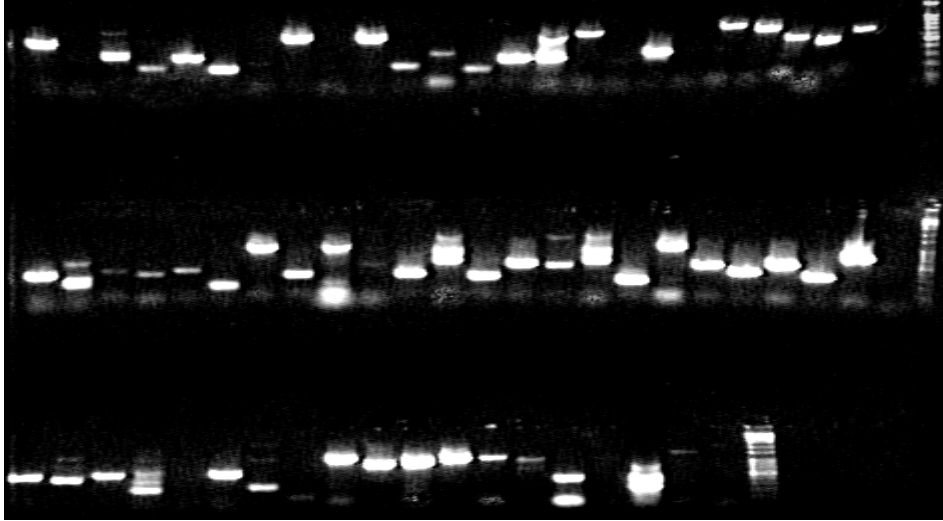


Fig 2.4. Results of RT-PCR with pig primers

Table 2.4. 각 primer의 염기 서열 및 증폭된 유전자의 크기

1	TGF-B2	21	TGFB3	41	PRA	61	VE cadherin
2	NGFRP	22	P53	42	TGFbT3R	62	inhibin beta(b)
3	EGF	23	c-kit ligand	43	CASP	63	RAR-r
4	VEGF-D	24	COX2	44	CUZN	64	inhibin beta(A)
5	IGFBP5	25	GAF	45	GPX	65	G3PD
6	IGFBR-6	26	PGFP	46	GAPDH	66	P-selection
7	TGF-a	27	N3P	47	CATA	67	HG5
8	EGFR	28	SHDGFRP	48	H3		
9	ILG1RP	29	VEGFR	49	NGFb		
10	GHR	30	LEDGF	50	VEGF		
11	PIGI	31	M/SCGFR	51	GAX		
12	HBEGFLP	32	TGF-Bip	52	ILGF1RP		
13	GAS2	33	TGFBP	53	GDF9B		
14	KGF	34	GHSRT16	54	IGFBR-3		
15	CGRF	35	HGFAIT2	55	VEGF		
16	H6P/IGF2R	36	KGFRSI	56	SARP		
17	GDF5	37	GADD45	57	plakoglobin		
18	AFGFBR	38	KGFRKSIM	58	TGFB2		
19	E-selection	39	LTGFbBP4S	59	B-catenin		
20	DGAT	40	KGFR	60	GHR		

*** 천연물이 돼지의 면역세포구성에 미치는 영향**

추출물중에 세포활성이 뛰어난 것을 골라 MTT assay 하였을 때 #81 과 #23 이 뛰어난 세포활성을 보여주었다(그림 2.5).

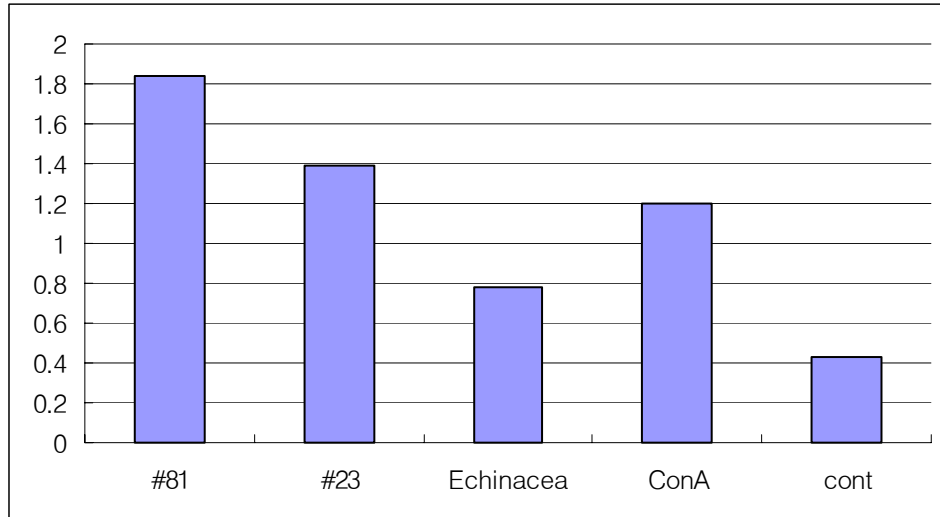


그림 2.5. MTT 분석을 통한 추출물의 세포 증식효과측정도. 추출물 50 ug/ml로 처리후 48 시간 후에 활성도 측정 (ConA는 10 ug/ml 로 처리)하였다.

FACS 실험결과를 살펴보면 다음과 같다.

추출물 #81과 #23에 대한 면역세포구성의 변화를 살펴보았다. Echinacea 와 ConA는 대조군으로 사용하여 실행하였다. 실험번호에 따라 각종 시약(추출물)들을 처리하였고, 처리군마다 항체는 대조군으로 IgG1을 사용하였고 실험군으로 B-FITC (B cell marker) CD4a-RPE (CD4 T cell marker), CD8a-FITC (CD8 T cell marker) CD3a-FITC (CD3 T cell marker)를 사용하였다.

실험순서는 다음과 같다.

- #1 Control
- #2 ConA(10ug/ml)
- #3 추출물 #81(5ug/ml)
- #4 추출물 #81(50ug/ml)
- #5 추출물 #81(250ug/ml)
-
- #6 추출물 Echinacea(5ug/ml)
-
- #7 추출물 Echinacea(50ug/ml)
-
- #8 추출물 Echinacea(250ug/ml)
- #9 추출물 #23(5ug/ml)
- #10 추출물 #23(50ug/ml)
- #11 추출물 #23(250ug/ml)

그림2부터 그림 12까지의 결과 Box에 대한 순서를 보는 방법은 밑의 표와 같이 살펴보면 되고 항체의 설명과 괄호 안은 gate에 대한 설명이다.

FSC-SSC			
IgG1(R1)	IgG1(R2)	IgG1(R3)	IgG1(Total)
CD3-FITC(R1)	CD3-FITC(R2)	CD3-FITC(R3)	CD3-FITC(Total)
CD4-PE/CD8-FITC(R1)	CD4-PE/CD8-FITC(R2)	CD4-PE/CD8-FITC(R3)	CD4-PE/CD8-FITC(Total)
B-FITC(R1)	B-FITC(R2)	B-FITC(R3)	B-FITC(Total)

결과를 보면 FSC-SSC 박스에서 gate를 R1, R2, R3로 열어서 살펴보았으며 최종적으로 Total에 대한 것을 살펴보았다. (컬러그림이 그림 7에 나타나 있음, Gate와 면역세포에 따른 컬러 spot)

실험#1에서는 돼지 비장면역세포의 기본적인 분포를 살펴 보았을때 CD3가 36%정도를 보여주었고 CD4가 8%, CD8이 15.9 %를 보여주었다. B cell이 8.28%를 보여주었다

실험 #4 와 #5를 보면 B cell, CD3, CD4와 CD8에 있어서 증가와 특이한 변화를 볼수가 있다. 이러한 현상은 추출물 #81이 면역세포의 구성변화를 일으키고 있음을 알 수 있다. T cell의 증가가 36%에서 38.3%, 73%로 증가됨을 볼수 있다. B cell은 8.28%에서 10.32%, 8.28%로 증감을 보여 주었다. 이러한 변화의 의미는 추출물 #81이 주로 T cell을 증가시키며 고농도 (250 ug/ml) 처리시 파격적인 Tcell의 증가를 볼 수 있다.

실험 #6, #7과 #8을 보면 고농도(250ug/ml)에서 주로 CD4 T cell이 증가하고 CD8이 감소하는 것을 볼 수가 있다. 저농도에서는 증감하는 것을 볼 수 없으나 세포활성 실험에서 효과가 좋은 것을 볼 때 전반적으로 면역세포를 활성화 시키나 세포의 구성변화에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다. 그러나 고농도에서는 CD4 T cell 에 대한 효과가 있는 것으로 보인다. (단 검사에 들어가 있지 않은 다른 종류의 세포를 특이적으로 활성화 시킬 수도 있다.)

실험 #9, #10과 실험 #11을 살펴 볼때 추출물 #23은 고농도 (250 ug/ml)에서 CD4의 증가를 볼 수 있으나 B cell은 감소하는 것을 볼 수 있었다.

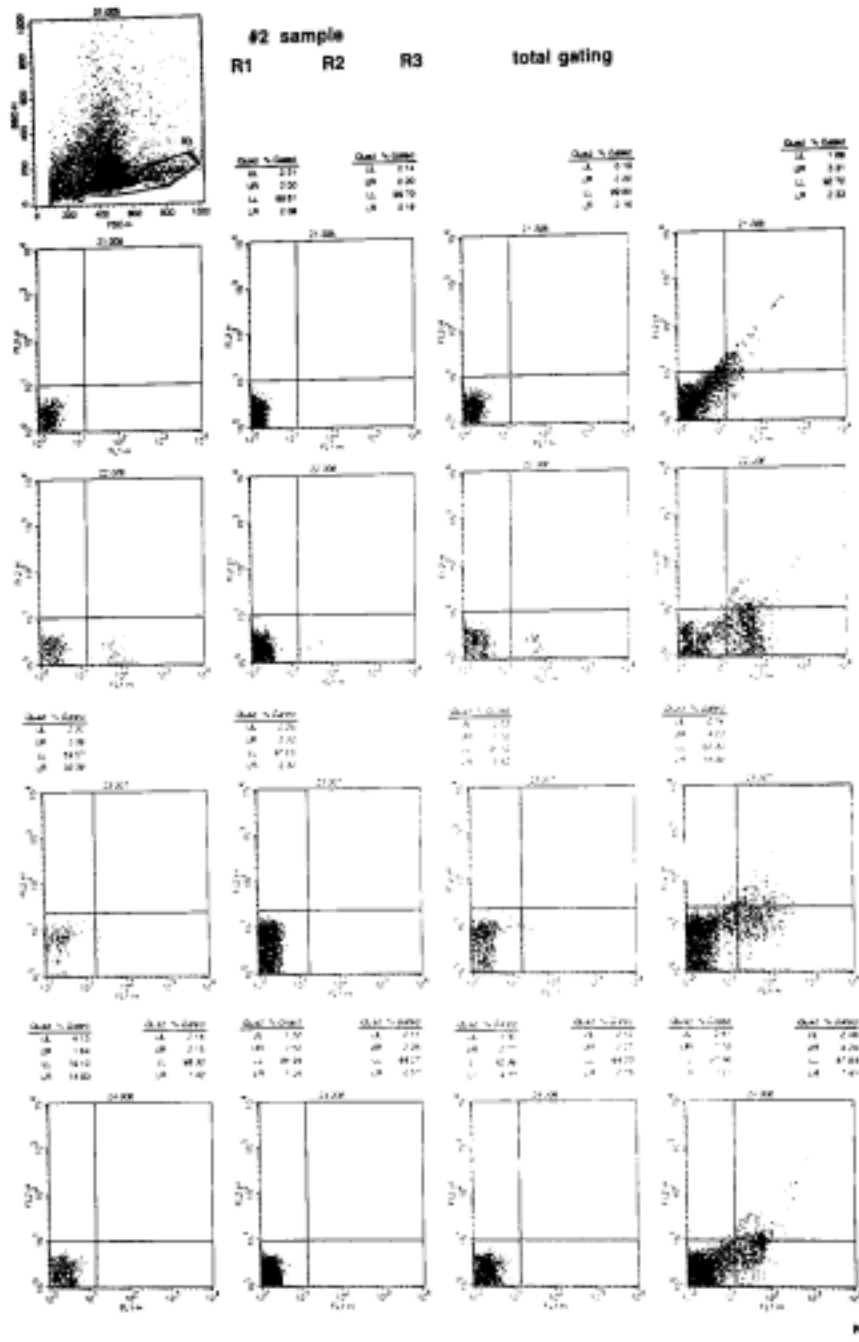


그림2.7. ConA 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

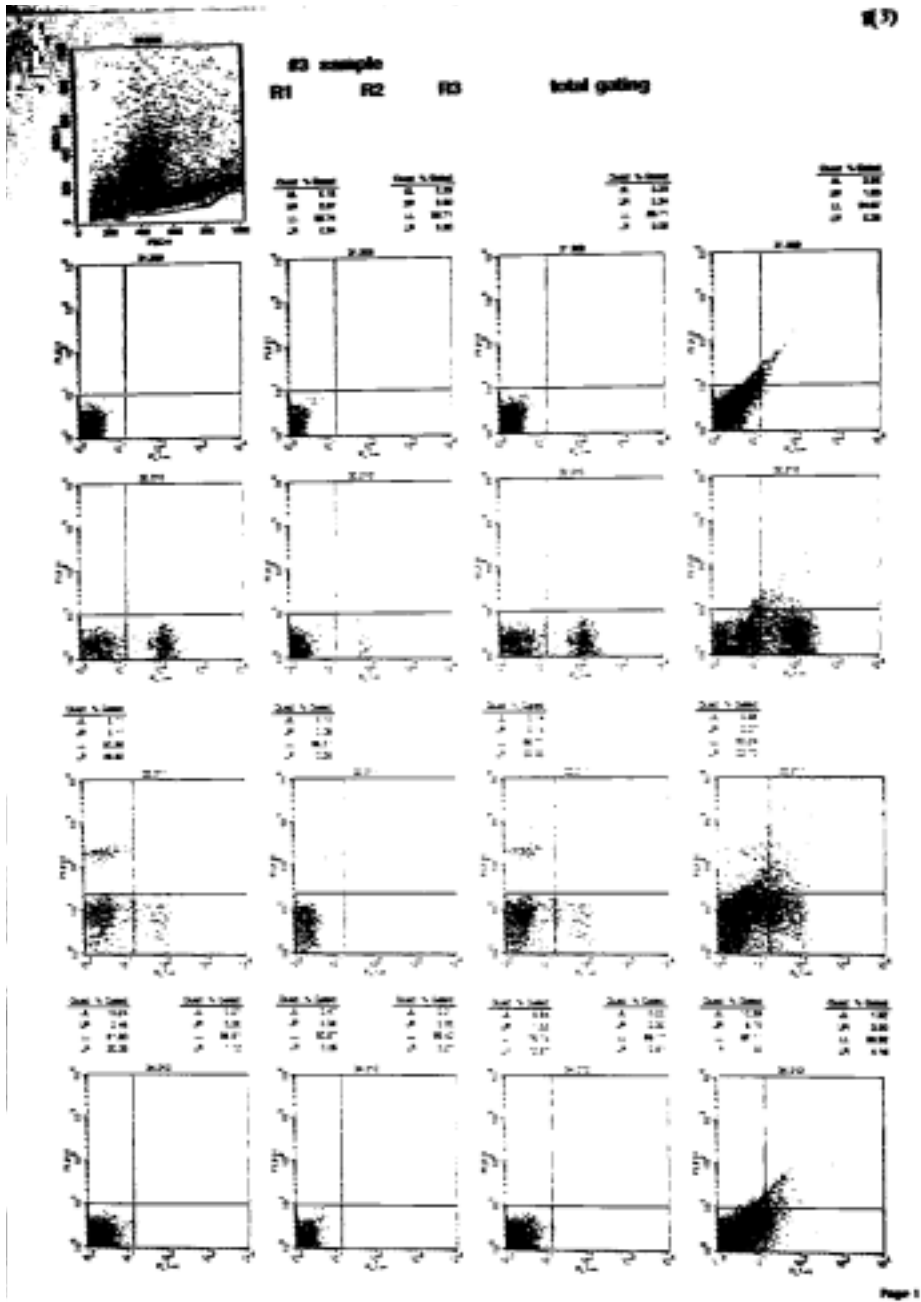


그림2.8. # 81 추출물 (5ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

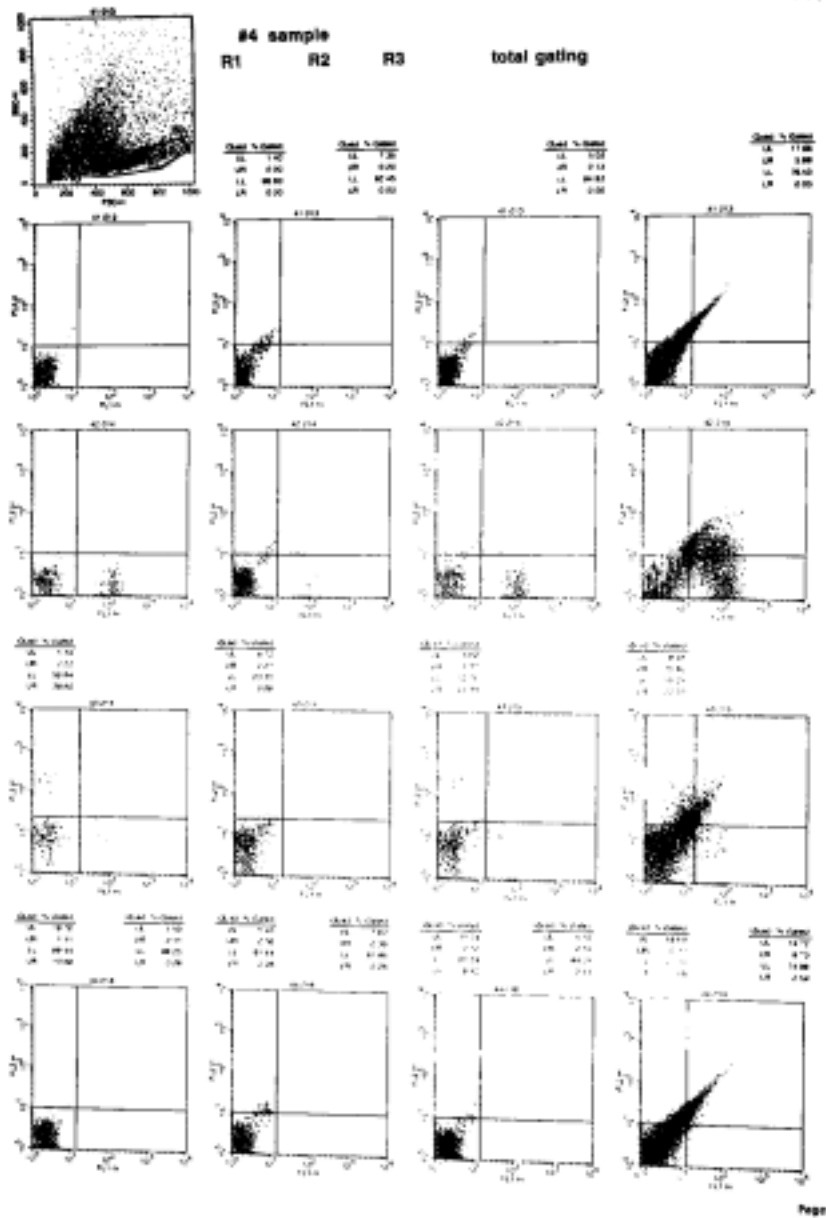


그림2.9 # 81 추출물 (50ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

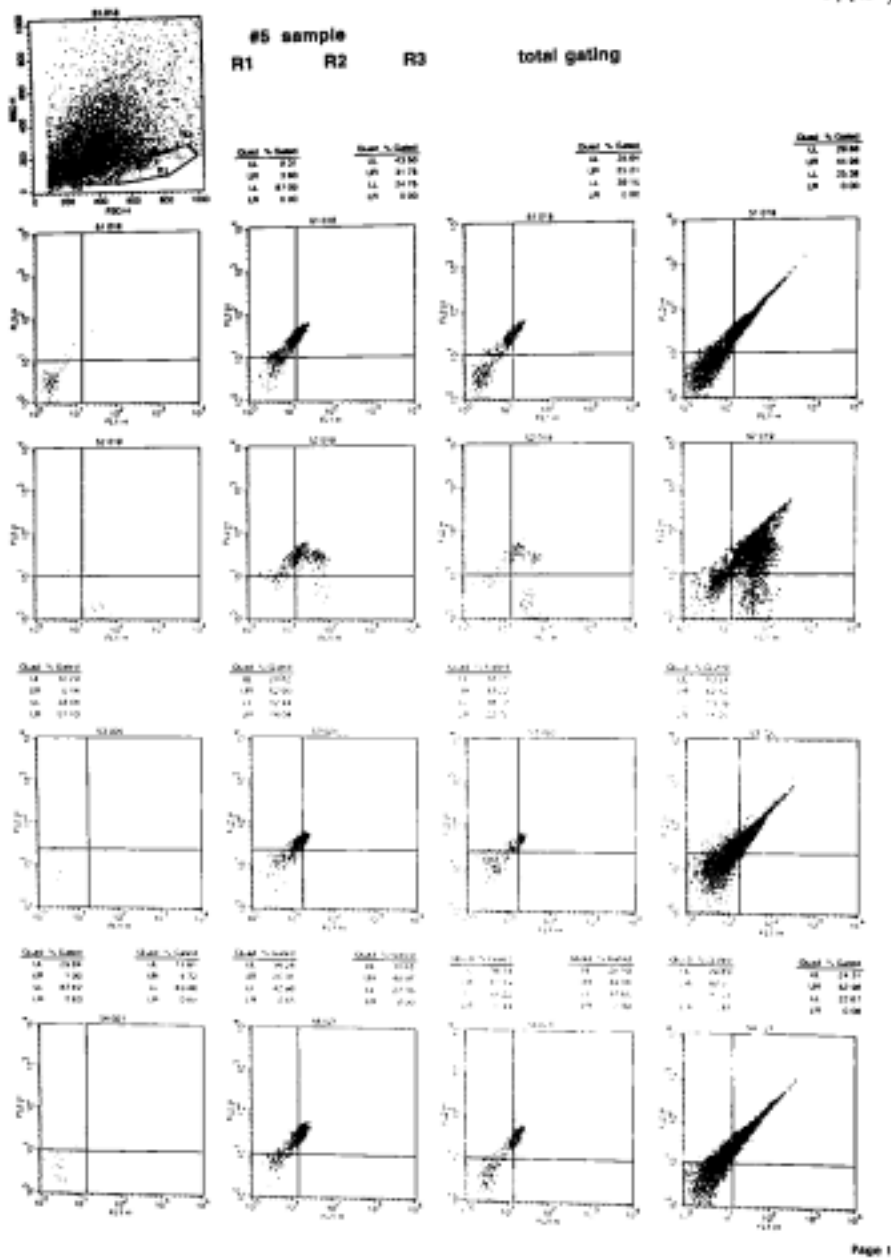


그림2.10 # 81 추출물 (250ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

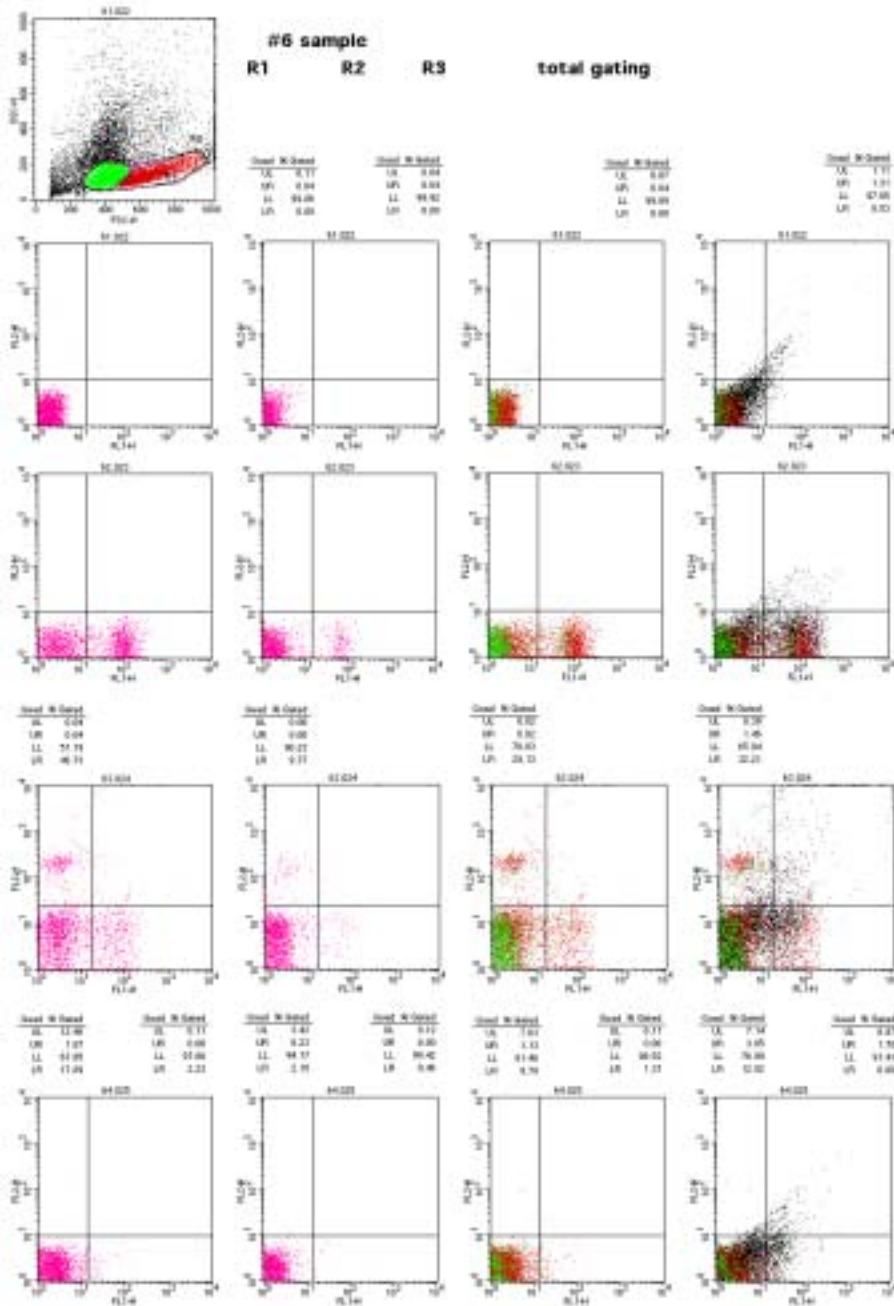


그림2.11. Echinacea 추출물 (5ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

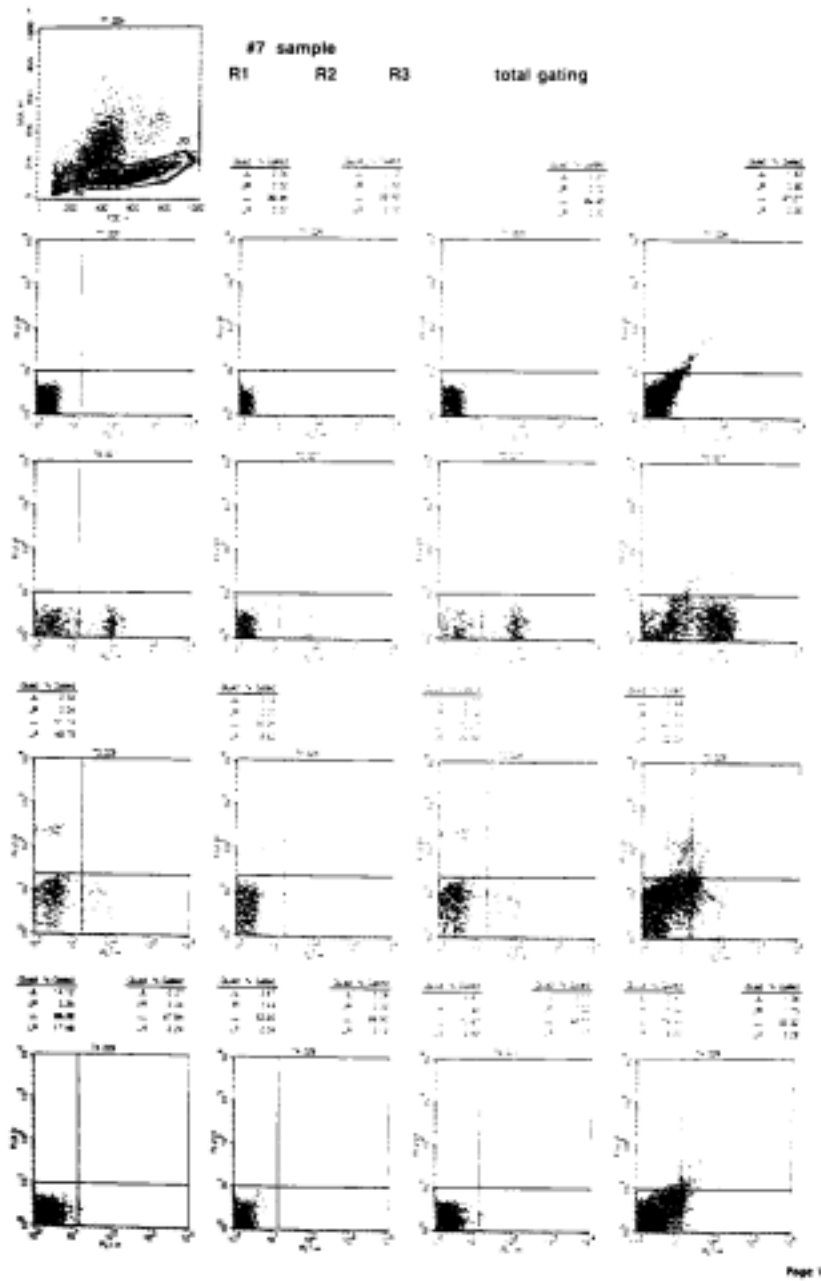


그림2.12. Echinacea 추출물 (50ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS

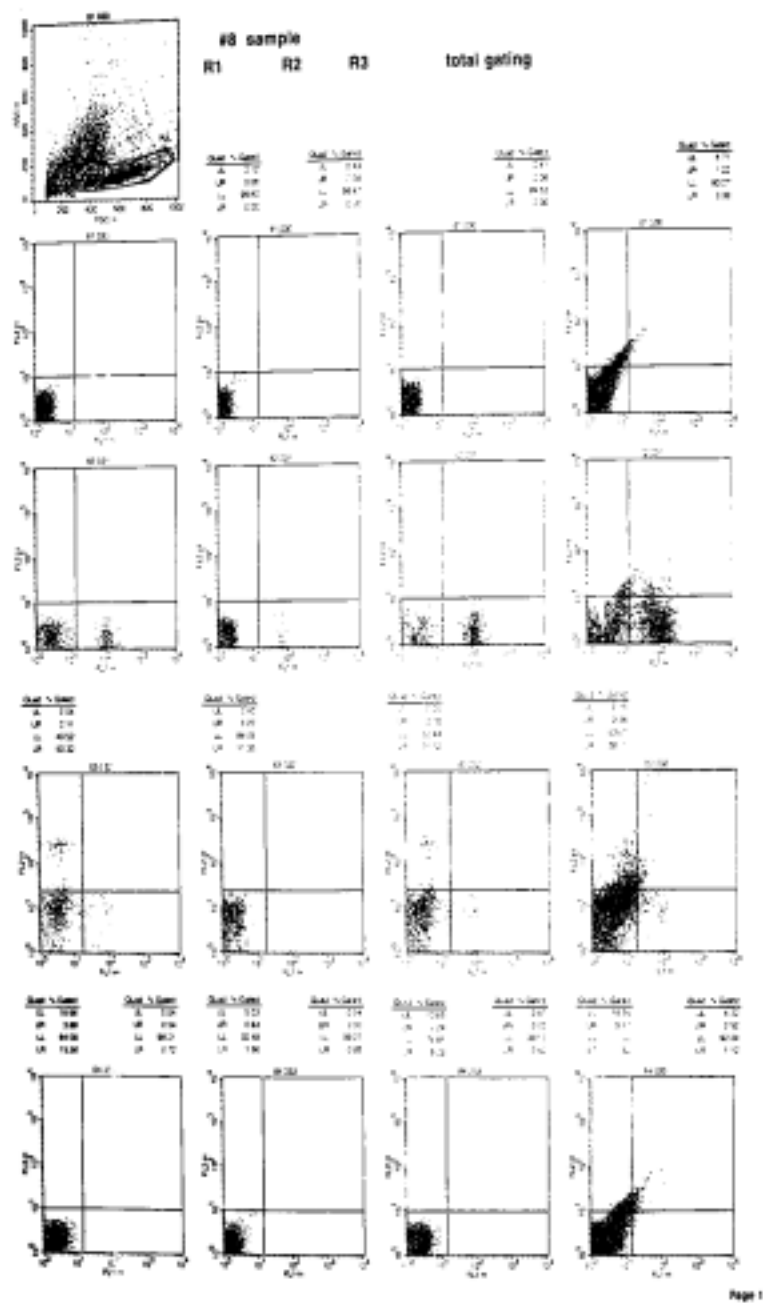


그림2.13. Echinacea 추출물 (250ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

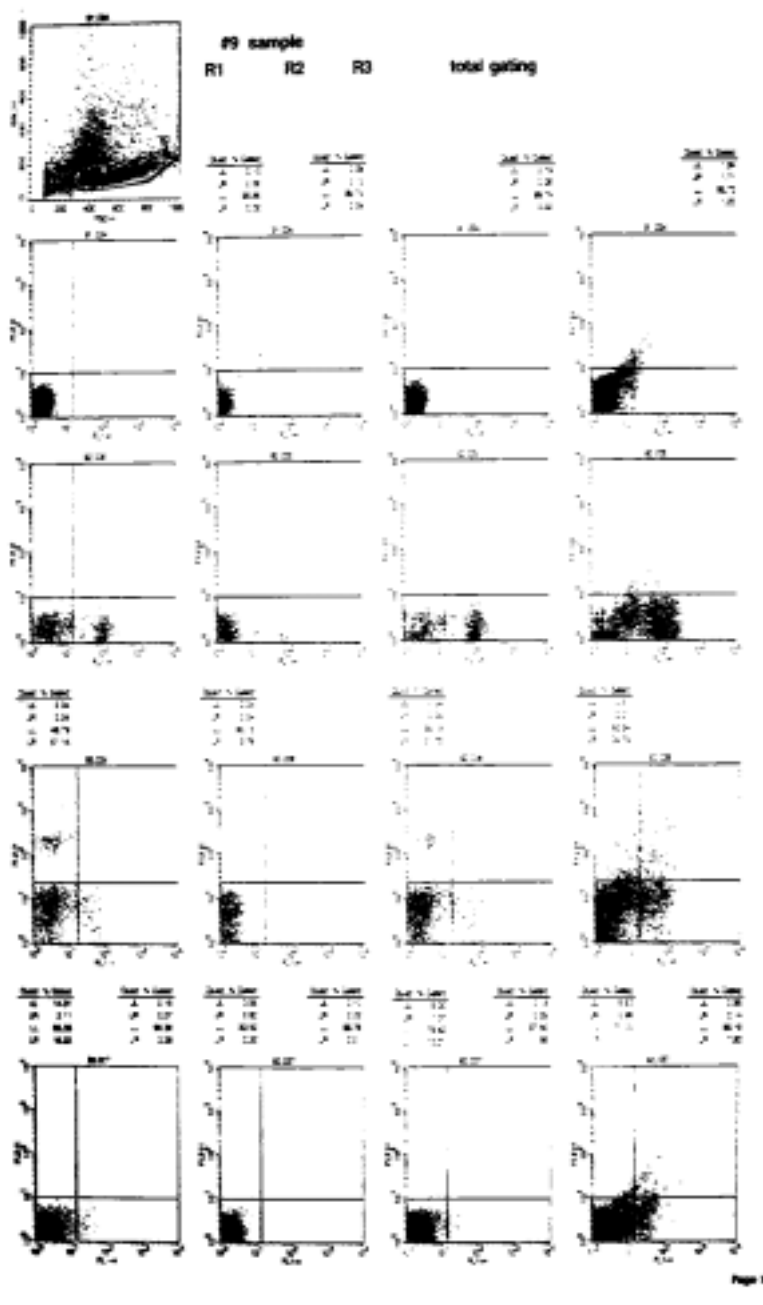


그림2.14. # 23 추출물 (5ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

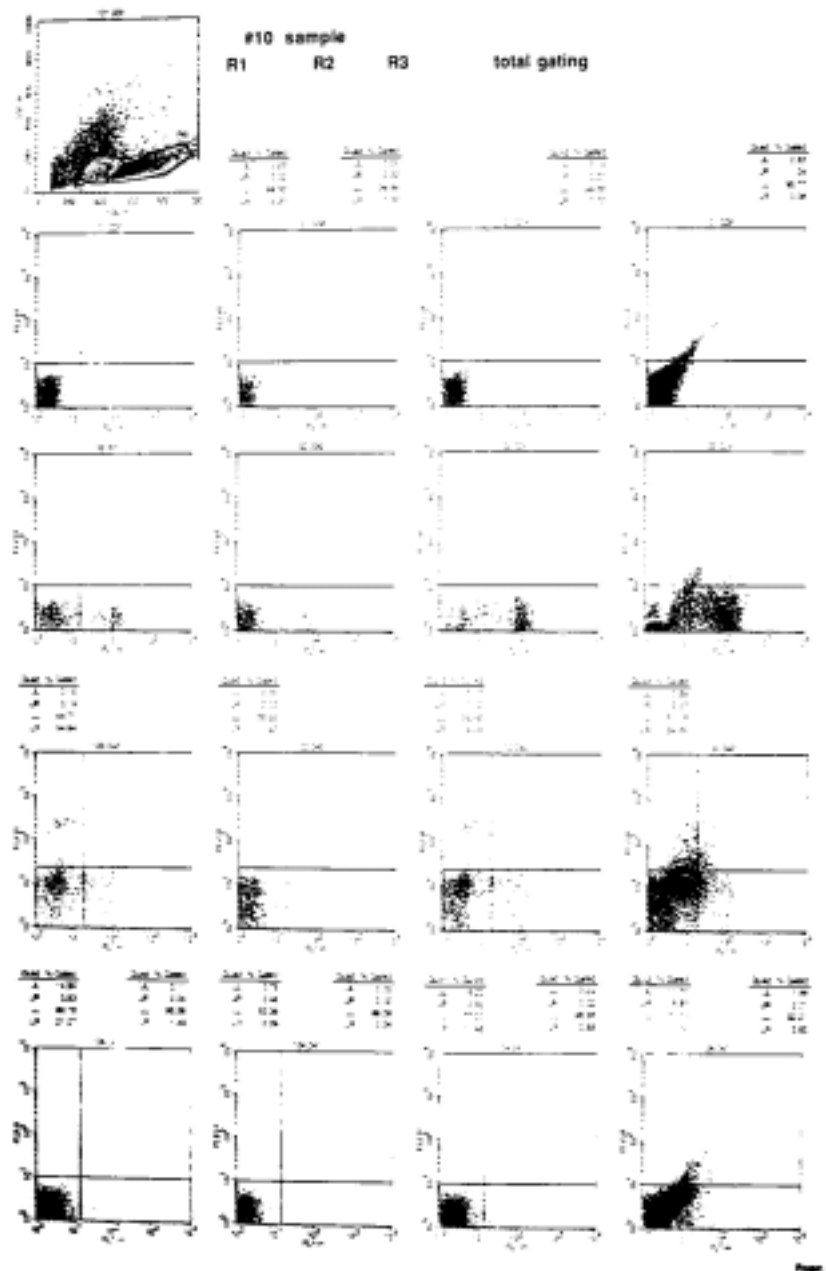


그림2.15 # 23 추출물 (50ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

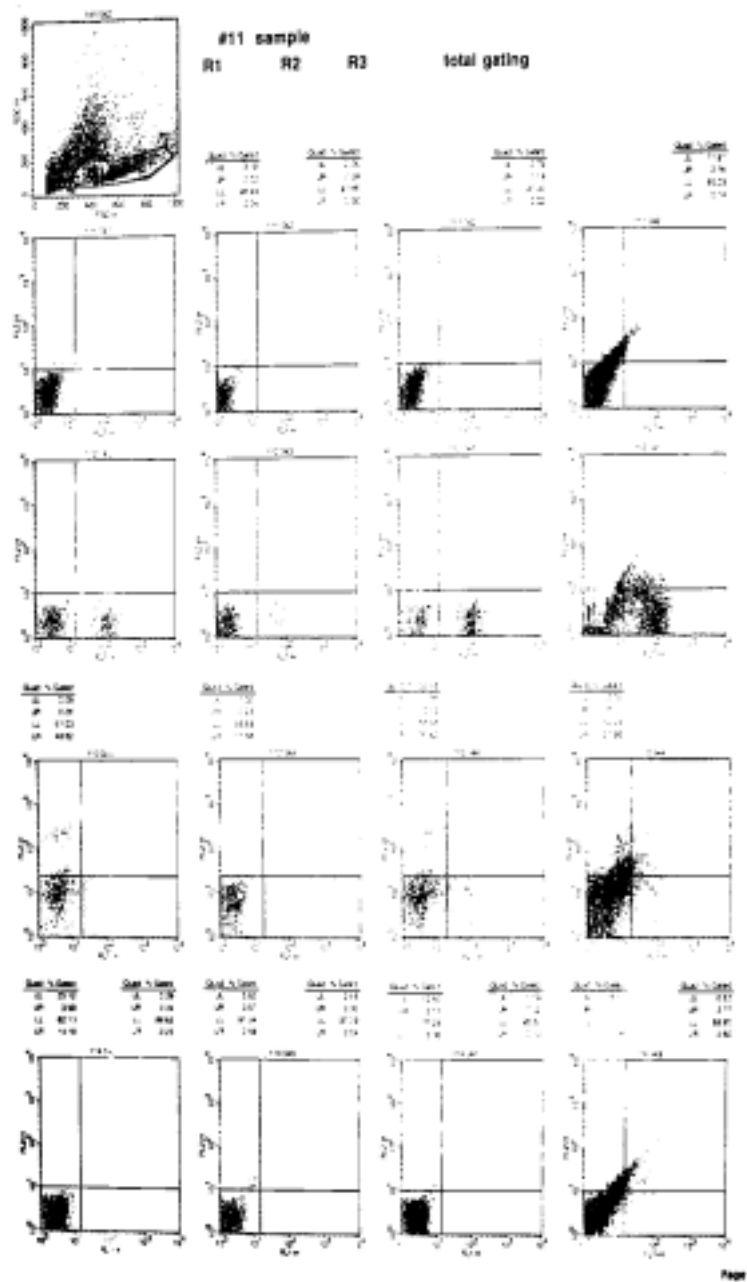


그림2.16 # 23 추출물 (250ug/ml) 처리 시 면역세포의 구성을 보여주는 FACS 결과

3) 천연물이 면역세포의 유전자 발현에 미치는 영향

RT-PCR을 통한 사이토카인(IL-2 IL-4, IFN-g, IL-12, TNF) 발현 양상을 검토하였다(그림 2.17). 이러한 조사를 통하여 볼 때 #81은 IL-2, TNF와 인터페론 감마의 증가를 시키는 것을 알 수 있으며 이것이 면역력을 증가시킴을 알 수 있다. 또한 Echinacea 와 #23도 약하게나마 IL-2와 TNF의 발현을 자극함을 볼 수 가 있다.



TNF 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



그림 2.17 사이토카인에 대한 RT-PCR 결과

lane No.	sample	시약처리 (ug/ml)
1	#81	5
2	#81	50
3	#81	250
4	Echinacea	5
5	Echinacea	50
6	Echinacea	250
7	#23	5
8	#23	50
9	#23	250
10	CON A	10
11	Control 1	
12	Control 2	

4) 클로닝된 유전자의 증폭과 돼지싸이토카인 유전자를 이용한 DNChip 제작

유전자를 다음과 같은 조건을 이용하여 증폭하였음

<조건>

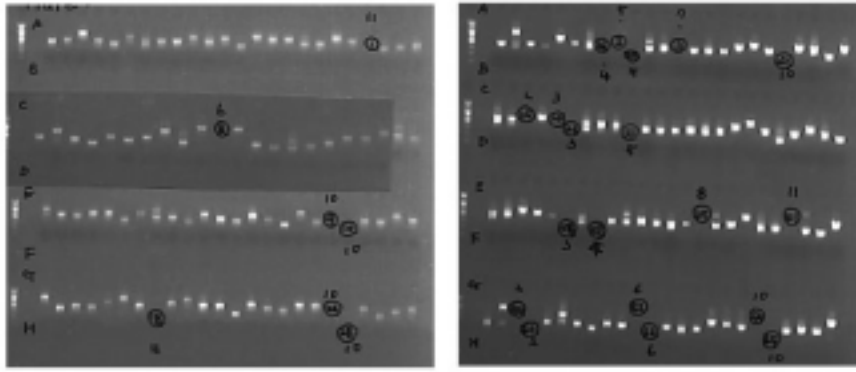
1단계: 94 °C 1분

2단계: 94 °C 40초, 55 °C, 30초, 72 °C 30초 33 cycles

3단계: 72 °C 5분

A

B



C

D, E, F

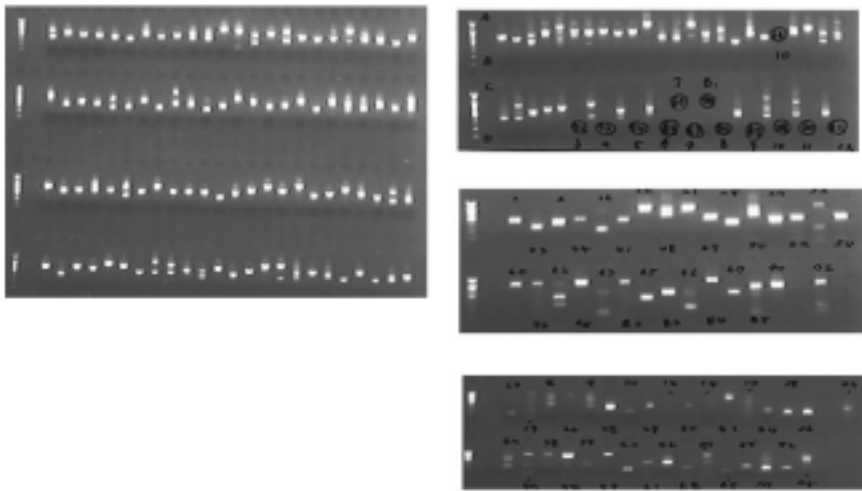


그림 2.18 A,B,C: Adipose tissue에서 Cloning 된 유전자

D,E,F: 클로닝된 싸이토카인 유전자

<DNA chip 제작>

선별유전자 : 돼지의 mRNA를 돼지 배아와 비장에서 추출하여 클로닝한 유전자와 특별히 제작한 싸이토카인 프라이머로 증폭한 유전자를 이용하였다. 그림 2.19 과 같이 유전자를 증폭하여 분리정제 후 DNACHIP 제작과정에 들어감

< 칩 제작과정 >

전체 289개의 유전자로서 여기에는 Control로 GAPDH, 돼지 genomic DNA와 Yeast clone을 포함하여 DNACHIP을 제작하였다.

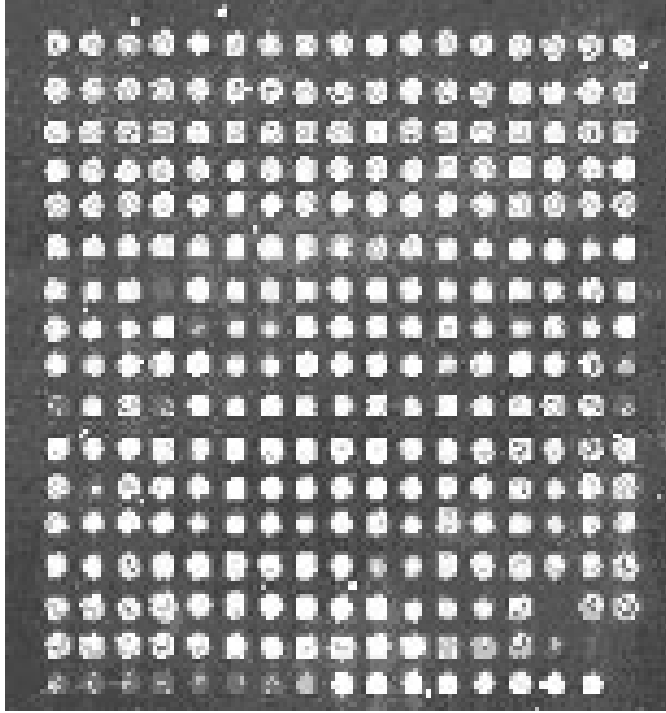


그림 2.19 돼지 유전자 257개와 Control 유전자 32개를 이용하여 만든 천연물 기능 탐색용 DNACHIP

여기에 들어간 싸이토카인 유전자는 다음과 같다.

1	TGF-B2	21	TGFB3	41	PRA	61	VE cadherin
2	NGFRP	22	P53	42	TGFbT3R	62	inhibin beta(b)
3	EGF	23	c-kit ligand	43	CASP	63	RAR-r
4	VEGF-D	24	COX2	44	CUZN	64	inhibin beta(A)
5	IGFBP5	25	GAF	45	GPX	65	G3PD
6	IGFBR-6	26	PGFP	46	GAPDH		
7	TGF-a	27	N3P	47	CATA		
8	EGFR	28	SHDGFRP	48	H3		
9	ILG1RP	29	VEGFR	49	NGFb		
10	GHR	30	LEDGF	50	VEGF		
11	PIGI	31	M/SCGFR	51	GAX		
12	HBEGFLP	32	TGF-Bip	52	ILGF1RP		
13	GAS2	33	TGFBP	53	GDF9B		
14	KGF	34	GHSRT16	54	IGFBR-3		
15	CGRF	35	HGFAIT2	55	VEGF		
16	H6P/IGF2R	36	KGFRSI	56	SARP		
17	GDF5	37	GADD45	57	plakoglobin		
18	AFGFBR	38	KGFRKSIM	58	TGFB2		
19	E-selection	39	LTGFbBP4S	59	B-catenin		
20	DGAT	40	KGFR	60	GHR		

Table 2.5 사용된 싸이토카인 유전자

<사용된 Control 유전자>

Yeast Saccharomyces cerevisiae intergeneic sequence 9-1

Yeast Saccharomyces cerevisiae intergeneic sequence 2-2

Yeast Saccharomyces cerevisiae intergeneic sequence 3-1

Yeast Saccharomyces cerevisiae intergeneic sequence 4-1

pL-luc luciferase gene 100ng/ul

Chromosomal DNA

GAPDH

제 3절 천연물의 급여가 돼지의 지방축적과 면역작용에 미치는 영향

사양실험에 사용할 천연물의 선택

in vitro 지방축적 관련 조사항목 즉 배양중인 지방세포의 분화정도와 지방조직의 지방합성을 측정하고 그리고 면역세포의 면역증강을 측정해서 복분자와 홍화를 돼지 사양실험 대상 한약재로 선택했다. 선택근거를 더 구체적으로 설명하면 복분자는 지방전구세포의 증식과 분화를 억제했으며, 홍화는 예상외로 촉진했다. 그러나 이 둘의 지방조직의 지방합성 억제작용은 나타나지 않았다. 면역증강작용은 MTT 분석법을 이용해서 면역세포증식정도를 측정한 결과 복분자와 홍화 둘다 세포증식을 촉진하였다.

복분자(raspberry)의 학명은 *Rubus coreanum* MZQUE이고 장미과에 속하고 산딸기로 알려져 있다. 복분자는 덜 익은 산딸기를 일컬으며 빨갭게 익은 것은 약효가 적다고 한다. 흔히 민간요법에서는 신장의 기능을 보강하고 정력을 도우는 것으로 알려져 있으나 면역증강이나 지방축적에 미치는 작용은 알려져 있지 않다.

홍화(safflower)의 학명은 *Carthamus tinctorion* L 이고 국화과에 속하고 이집트 원산지이다. 꽃과 종자 두 가지가 있는데 본 연구에서는 꽃을 사용했다. 꽃은 혈액순환을 돕고 가래를 없애고, 통증을 멎게 하는 효능이 있는 것으로 알려 졌는데, 본 연구에서 확인할 면역증강 또는 지방축적조절에 관한 연구는 알려져 있지 않다. 홍화의 홍색 색도를 나타내는 것은 carthamin이다.

1. 복분자와 홍화급여 실험

가. 재료 및 방법

시판중인 비육돈 후기 사료에 복분자와 홍화를 각각 1%씩 섞어서 시험사료를 제조해서 체중 80kg인 암돼지에 4주 동안 급여했다. 체중, 등지방두께 및 blood lipid profile, 지방합성 및 지방합성 관련 효소의 활성화도 및 면역세

포의 증식 정도을 조사했다.

1) 처리구 설명

대조구(시판 비육돈 사료), 복분자1%(비육돈사료에 복분자 1% 함유), 홍화 1%(비육돈 사료에 홍화 1% 함유) 3처리를 두고 각 처리당 체중 80kg 암돼지 5마리 총 15마리를 사용했다.

2) 사료급여

시험사료는 위에서 설명한 사료를 무제한 급여했다. 시험사료의 배합을 와 영양소 함량은 Table 3.1에서 보는 바와 같다.

Table 3.1 Formula of experimental diet

Ingredient	%
Corn	42.25
Wheat	20.0
Ricebran	2.0
SBM(DOM)	7.0
SBM(BR&USA)	12.89
Rape seed	3.0
Animal fat	3.98
Mealasses	3.0
Limestone	1.05
Tricalcium phosphate	0.25
Salt	0.31
Threonine (99%)	0.0307
Lysine (25%)	0.6107
Methionine (80%)	0.0045
Choline (50%)	0.0730
Dodmix 2-2	0.2
Flavomycin	0.1
Natuforman	0.2
Bodzyme	0.05
Fenbmdagote	0.1
total	100

3) 채혈

돼지가 서있는 자세에서 경정맥에서 채혈했는데 plasma를 분리해서 전문 분석기관에 의뢰해서 총 cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 triglyceride 분석했다.

4) 등지방두께 측정

살아있는 돼지에서 마지막 갈비 부위에 초음파 기계로 측정했다. 시험개시 시와 종료 시에 측정했다.

5) 지방조직 채취

각 처리구의 5마리 돼지 중 시험 종료 시에 체중을 측정해서 증체량이 가장 작거나 큰 돼지는 제외하고, 2,3,4위인 3마리의 돼지의 제 1늑골 부근에서 biopsy gun에 의해 지방조직을 떼어냈다. 지방조직 두 plug를 떼어내어 지방 합성(lipogenesis)측정할 것은 37°C 보관상태에서 바로 측정했고, 지방합성 관련 효소측정을 위해서는 dry ice 얼려 뒀다가 필요할 때 측정했다.

6) 지방조직의 지방합성 측정

앞에서 이미 설명한 대로 각 돼지에서 떼어낸 지방조직 절편을 14C-glucose가 함유된 vial에 넣어 2시간 동안 incubation하면서 14C-glucose가 14C-lipid로 전변된 양으로 측정했다.

7) 지방합성관련효소 LPL의 측정

Extracellular fraction에 존재하는 LPL을 Nilsson Ehle과 Schotz()방법을 응용한 Freid와 Zechner()방법에 의하여 측정하였다. 지방조직(약 20~40mg)은 1% bovine serum albumin(BSA)와 heparin (10U/mL)을 함유한 0.5ml M199(Hanks salts)에 넣은 후 shaking water bath 24°C에서 45분간 배양하여 효소분석용 시료를 만들었다. 효소활성을 위한 기질은 ³H-triolein에 phosphatidylcholine과 triolein을 넣고 냄새가 없어질 때까지 질소가스를 용액표면에 쬐어준 후, glycerol을 첨가하여 6분 정도 sonication 시켜 제조했다. 효소반응은 배양시킨 효소분석용 시료 150 μ l와 ³H-triolein emulsion을 기

초로 만든 기질 150 μ l을 함께 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양시켜 수행하였고 이때 생성되는 free fatty acid의 radioactivity를 측정하여 HR-LPL 활성을 계산하였다.

8). FACS를 이용한 면역세포분석

처리군마다 항체는 대조군으로 IgG1을 사용하였고 실험군으로 B-FITC (B cell marker) CD4a-RPE (CD4 T cell marker), CD8a-FITC (CD8 T cell marker) CD3a-FITC (CD3 T cell marker)를 사용하였다.

9). 비장의 면역세포 배양

돼지 비장을 으깨어 PBS에 세포가 빠져나오도록 한다. 15ml centrifuge tube에 Histopaque 5ml을 넣은 후 비장조직의 세포가 든 PBS 10ml을 그 위에 올려 층이 생기게 하였다. 2,500rpm에서 30분간 원심분리 한 후 중간층의 백혈구 층을 따내어 50ml tube에 담았다. PBS로 40ml이 되도록 채워 1000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 pellet에 PBS로 세척한 후 RPMI에 현탁하여 culture dish에 10ml씩 담는다. Lymphocytes를 분리 한 후 복분자를 100ug/ml로 처리하여 4시간 후 세포를 모은 후 total RNA는 TRIzolTM (Life Technologies Ltd., MD)과 RNeasy[®] MinEluteTMCleanup kit (Qiagen)을 이용하여 분리 및 정제하였다. 추출한 RNA를 Spectrophotometry방법으로 260nm에서 RNA 농도를 측정하였다. Total RNA는 실험 전까지 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

신생 암돼지에서 지방조직을 떼어내어 collagenase를 처리하여 지방전구세포를 분리하였다.

분리한 지방전구세포를 DMEM F-12(10% FBS)에 현탁하여 dish에 3 \times 10⁶/well로 seeding하였다. 다음날 cell을 wash하고 난 뒤 5% FBS를 함유한 F-12 DMEM으로 배양하였다. ITC(insulin, transferrin, cortisol)로 세포분화를 유도 하였으며 100ug/ml의 농도로 홍화를 처리하였으며 4일 후 total RNA를 추출하였다.

10). DNA chip 실험 방법

가) cDNA Synthesis 및 cDNA Hybridization and Wash

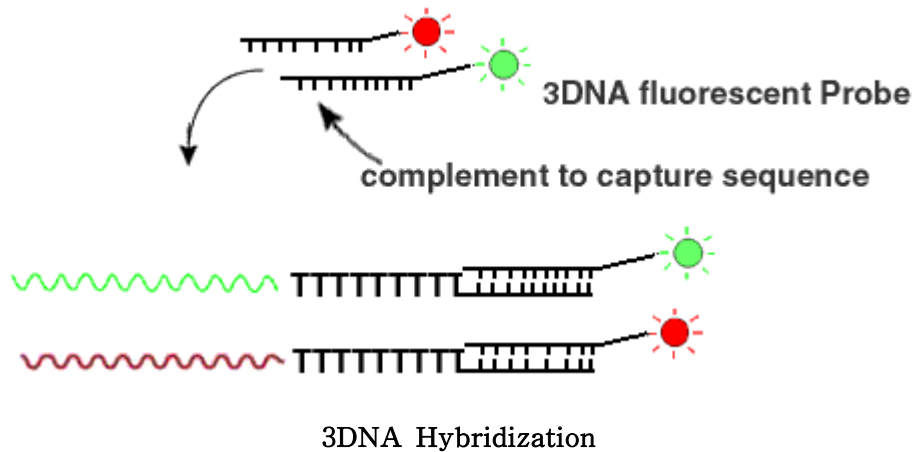
각각의 Total RNA 1 μ g에 대조군에는 Cy3 Primer를, 실험군에는 Cy 5 primer를 각각 1 μ l씩 넣고 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 시킨 후 ice에 둔다. 5 \times SuperScript II First Strand Buffer 2 μ l, dNTP mix 0.5 μ l, Superase-In RNase Inhibitor 0.5 μ l 및 reverse transcriptase 0.5 μ l를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 반응을 중단시키기 위해 1M NaOH/100mM EDTA를 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켜 RNA를 분해시켰다. 그 후 2M Tris-HCl(pH 7.5)를 넣어 중화 시킨 후 cDNA Hybridization에 이용하였다. 합성된 대조군 cDNA 12.7 μ l와 실험군 cDNA 12.7 μ l를 새 tube에 넣고 2 \times Enhanced cDNA Hybridization buffer 27.4 μ l, LNA dT Blocker 2 μ l를 넣어 cDNA Hybridization Mix를 만든 후 75 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. Prewarmed Microarray에 cDNA Hybridization mix를 올리고 기포가 들어가지 않도록 coverslip을 조심스럽게 덮은 후 dark humidified chamber에 넣었다. 실험에 이용한 porcine chip은 70mer oligonucleotide spotted arrays여서 60 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다.

반응이 끝난 Microarray를 prewarmed 2 \times SSC, 0.2% SDS wash buffer에 5min정도 둔 후 Coverslip을 제거하고 42 $^{\circ}$ C로 데워진 2 \times SSC, 0.2% SDS wash buffer로 20분간 세척한 후 2 \times SSC wash buffer로 20분간 세척하였다. 마지막으로 0.2 \times SSC Wash buffer로 20분간 세척하였다. 세척 후 즉시 900rpm으로 2분 동안 원심분리하여 microarray에 얼룩이 생기지 않도록 하였다.

나) 3DNA Hybridization and Wash

암실에서 3DNA Array 900 Capture reagent Cy3 2.5 μ l, Cy5 2.5 μ l와 2 \times SDS-Based Hybridization buffer 27.5 μ l를 혼합하여 3DNA Hybridization mix를 만들었다. 이때 fluorescent dyes post hybridization의 fading을 감소시키기 위해 Anti-Fade reagent를 0.275 μ l를 넣었다. 3DNA Hybridization mix를 75 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 Prewarmed Microarray에 올리고 조심스럽게 coverslip으로 덮은 후 Microarray를 dark humidified chamber에 넣

고 60°C에서 5시간 반응시켰다. 반응이 끝난 Microarray를 prewarmed 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer에 5min정도 둔 후 Coverslip을 제거하고 42°C로 데워진 2× SSC, 0.2% SDS wash buffer로 20분간 세척한 후 2× SSC wash buffer로 20분간 세척하였다. 마지막으로 0.2×SSC Wash buffer로 20분간 세척하였다. 즉시 900rpm으로 2분 동안 원심분리하여 microarray에 얼룩이 생기지 않도록 하였다. 3DNA Hybridization부터는 암실에서 실험하였다.



Microarray에 부착된 fluorescent dyes의 산화를 막기 위해 Microarray 표면에 DyeSaver2를 뿌려주어 coating하였다.

11). Signal detection 및 cDNA microarray data의 분석

ScanArray 4000(GSI Lumonics)을 이용하여 Cy 3는 550nm의 파장에서 scan하였고 Cy5는 650nm의 파장에서 scan하여 fluorescent images를 얻었다. 결과 분석은 GenePix 6.0 software를 이용하여 일자별 이미지를 얻었고 각 spot의 intensity는 background intensity를 제거한 median값으로 취하였다. Vector Xpression 3.0을 이용하여 M-A로 보정 후 다시 Lowess normalization을 통하여 각 단계별 M값이 1이상 또는 -1 이하의 유전자들이 성장단계를 거쳐 가면서 어떠한 양상을 보이는지 살펴보았다.

◇ M-A normalization

$$\Delta b = \log_2 \left(\frac{cy5}{cy3} \right) \quad (\text{where } 1 \leq i \leq 14688)$$

$$\Delta c = \sqrt{\log_2 (cy5 \times cy3)} \quad (\text{where } 1 \leq i \leq 14688)$$

◇ Lowess (Locally Weighted Linear Regression) normalization

$$\begin{aligned} \log_2(\pi) - \log_2(\pi) - \gamma(x) \\ &= \log_2(\pi) - \log_2(2^{\gamma(x)}) \\ &= \log_2 \left(\frac{\pi}{2^{\gamma(x)}} \right) \quad \text{where } \begin{cases} \pi = \frac{cy5}{cy3} \\ \gamma(x) \text{ is the function of ratio on intensity} \end{cases} \end{aligned}$$

나. 결과 및 고찰

Table 3.2 에서 보는 대로 복분자 1%와 홍화 1%를 함유한 비육돈 사료를 돼지에게 급여해도 일당증체량과 등지방두께는 유의차를 나타내지 않았다. 일당증체량은 한약재를 섞은 구가 오히려 떨어지는 경향을 나타냈다. 등지방두께는 복분자 1% 첨가는 별 영향을 나타내지 않았지만 홍화 1% 첨가구는 유의차는 없었지만 대조구에 비해 높은 경향을 나타내는데 이것은 지방세포 분화 촉진작용을 나타낸 in vitro 실험 결과를 잘 반영해주고 있다.

Table 3.2. Effect of dietary raspberry and safflower on growth performance in the growing pig

	Control ^a	Raspberry ^b	Safflower ^c	p value
Initial body wt, kg	81.7±1.06	79.7±2.477	80.7±2.93	p=0.8290
Final body wt, kg	107.8±2.124	104.1±3.45	105.3±3.565	p=0.7004
Average daily gain, kg	0.932±0.072	0.871±0.046	0.848±0.069	p=0.7676
Initial backfat, Cm	11.0±0.89	11.2±0.37	11.8±0.80	p=0.7259
Final backfat, Cm	16.8±1.71	16.6±2.22	19.8±1.31	p=0.3966

a. Cost group was fed commercial growing finishing daet for 4 weeks
 b,c one % or Raspberry and safflower was added to cont diet.

Table 3.3 에는 각 처리별 혈중 총 cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 triglyceride 농도가 나타나 있다. 뚜렷한 차이를 나타내지는 않으나, 복분자 1% 함유구는 다른 구에 비해 혈중 LDL-cholesterol이 낮은 경향을 나타냈다. 유의차는 없었으나 복분자 1% 함유구의 혈중 triglyceride 함량이 낮은 경향으로 나타냈다.

Table 3.3. Effect of dietary rasp berry and safflower on blood lipid profile in the growing pig

	Control 1	Raspberry	Safflower	p value
Total cholesterol, mg/dl	89.0±3.64	85.2±5.59	88.00±1.22	p=0.7810
HDL cholesterol, mg/dl	36.8±0.73	34.00±3.098	35.00±2.00	p=0.6619
LDL cholesterol, mg/dl	43.4±3.55	43.4±3.26	43.8±1.93	p=0.9941
Triglyceride, mg/dl	31.8±2.47	21.6±4.22	26.6±6.49	p=0.3407

Figure 3.1에는 각 처리구의 사료를 4주 동안 급여하고 난 뒤 등지방 조직을 biopsy해서 측정한 지방합성(lipogenesis)의 결과가 나타나 있는데 예상외로 복분자 1% 함유구의 지방합성량이 대조구에 비해 높았다. 지방합성량과는 반대로 떼어낸 지방조직 LPL activity는 한약재 투입구가 더 낮았다.(Fig 3.2)

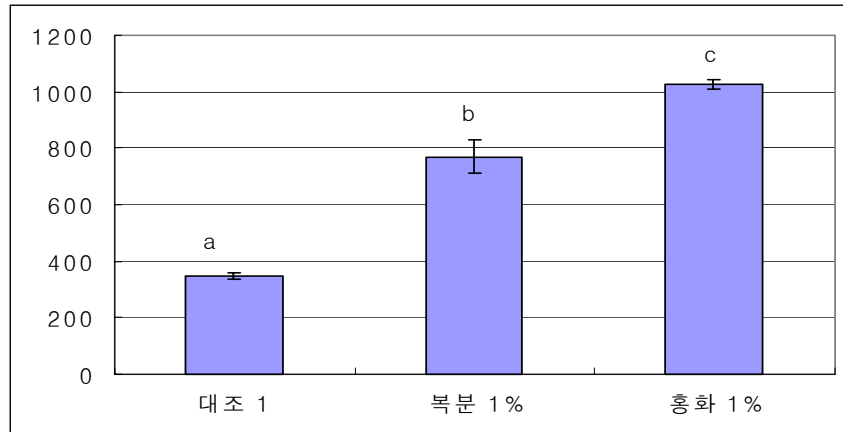


Fig 3.1 Adipogenesis on pig adipose tissue whose feed contain one percent of raspberry or safflower during 4weeks.

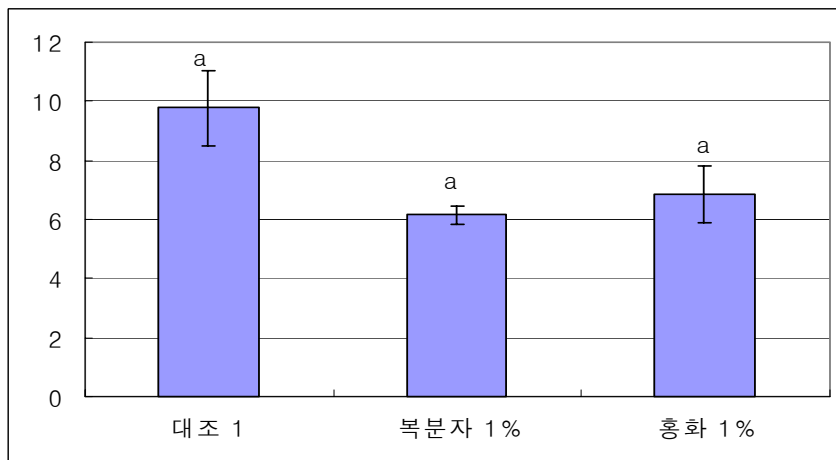


Fig 3.2 The LPL activity of pigs whose feed contain one percent of raspberry or safflower during 4weeks.

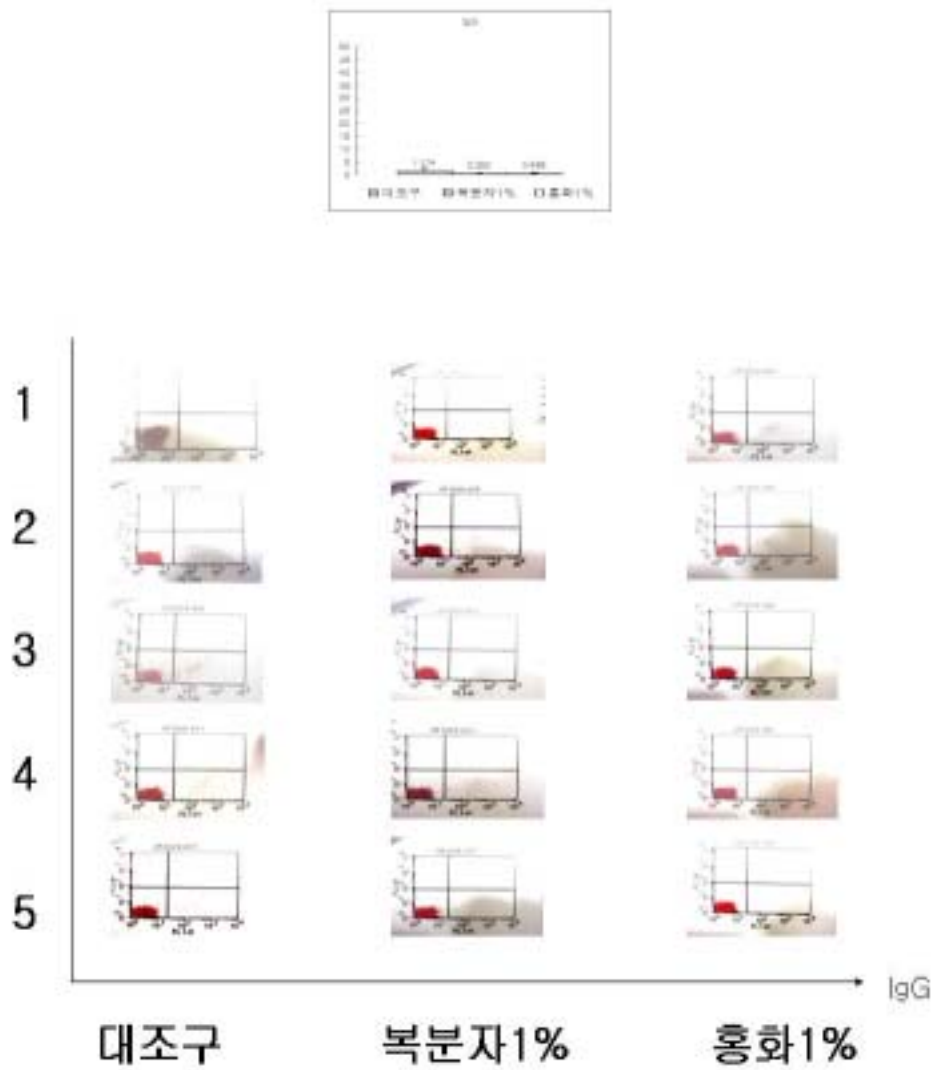


Fig 3.3 돼지에 복분자와 홍화를 처리하였을때 IgG에 대한 분포 (Control)

1%의 복분자와 1%의 홍화 처리시 lymphocytes에서 control로서 anti-guman IgG-FITC를 control로하여 비특이적 반응을 본 그림으로서 적절히 실험이 잘되고 있음을 Fig3.3에서 볼 수 있다.

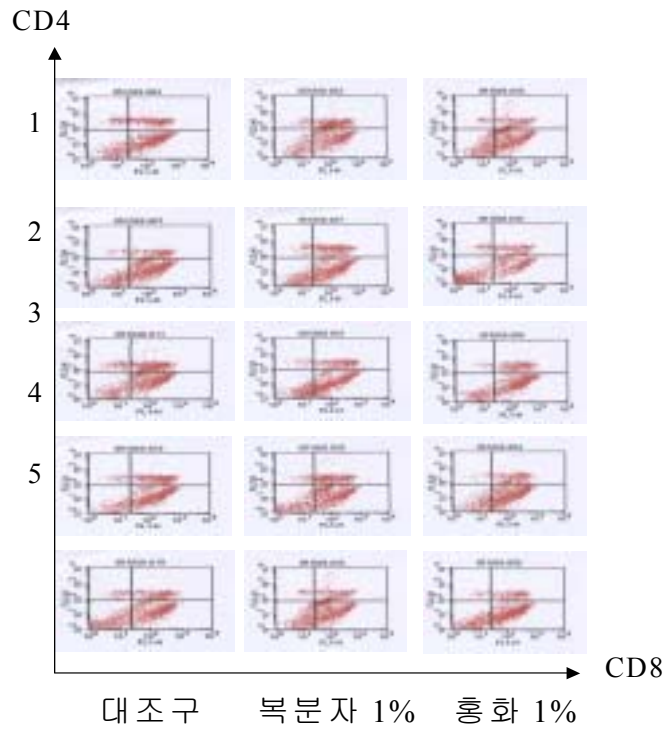
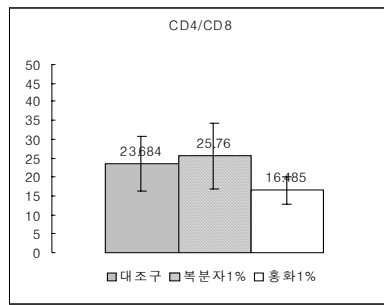


Fig 3.4 FACS 분석을 통한 CD4/CD8에 대한 면역세포의 분포도 (처리 후 2 주)

Fig 3.4에서 보면 홍화 1% 경우 CD4/CD8 T cell의 비율이 낮아지는 것을 볼 수 있다. (p=0.062)

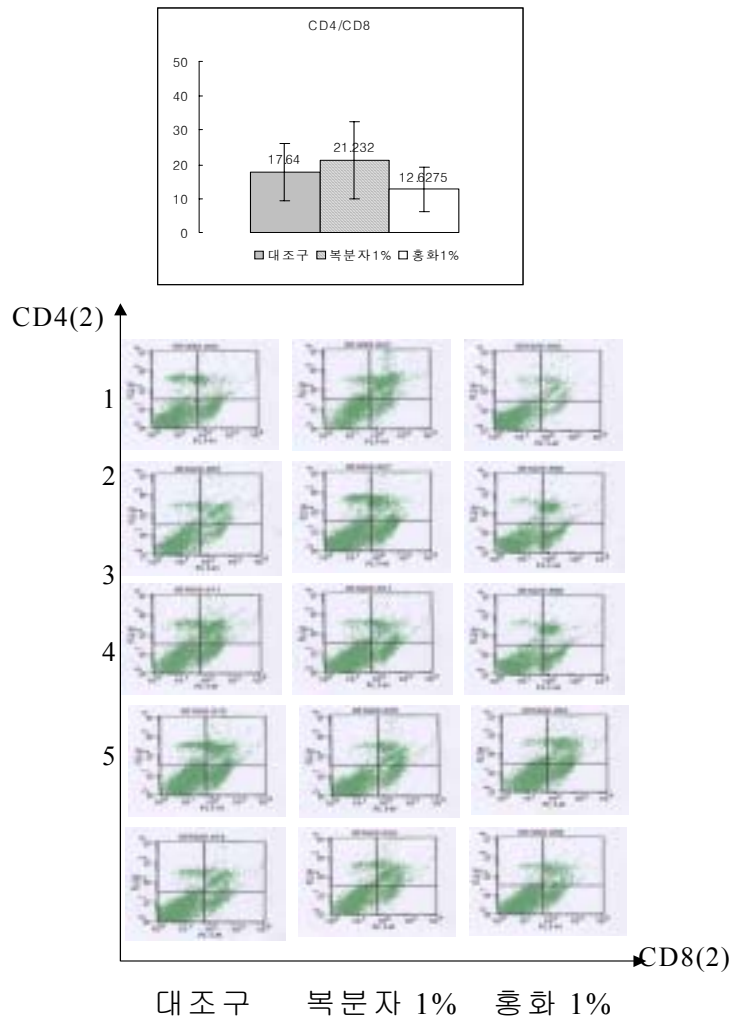


Fig 3.5 FACS 분석을 통한 CD4/CD8에 대한 면역세포의 분포도 (비림푸구 영역) (처리 후 2주)

비림푸구영역의 면역세포 변화를 살펴보면 복분자 1%에서 CD4/CD8 T cell의 비율은 증가하는 경향을 보이나 홍화에서는 감소시키는 경향을 보인다. (p=0.347)

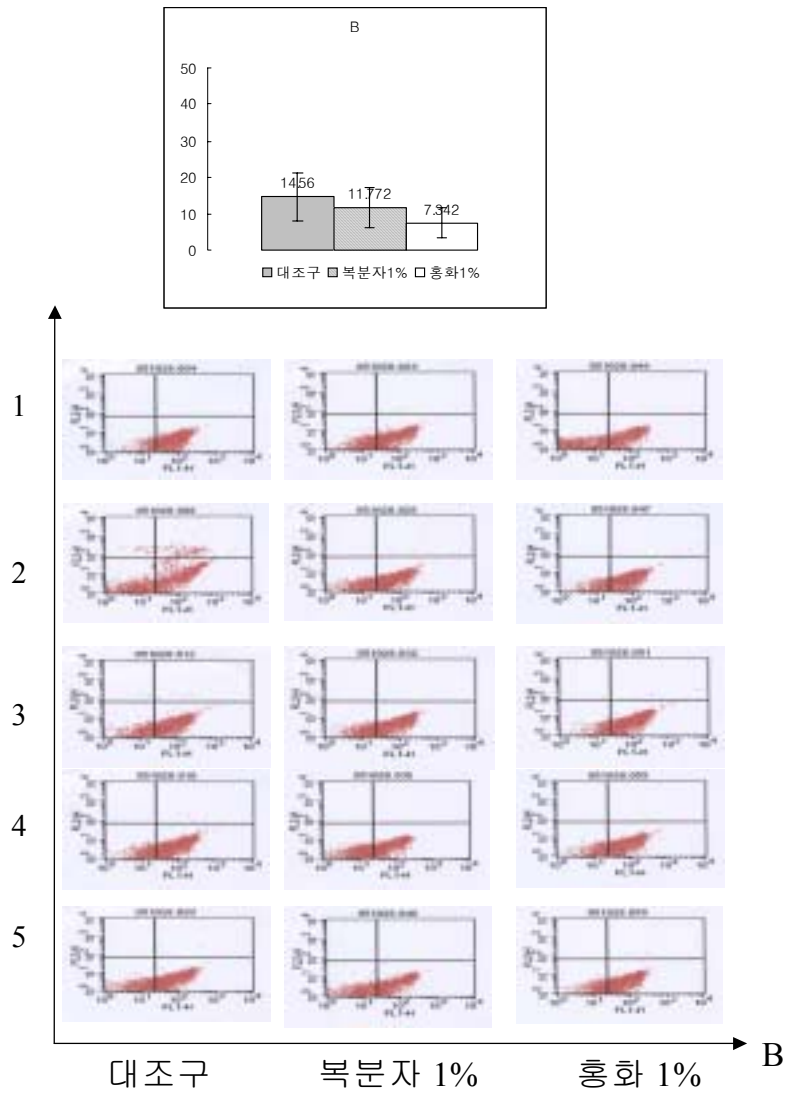


Fig 3.6 FACS 분석을 통한 B에 대한 면역세포의 분포도 (처리 후 2주)
 홍화1%그룹에서 B 림파구의 변화가 줄어들고 있음을 볼 수 있다. (p=0.067)

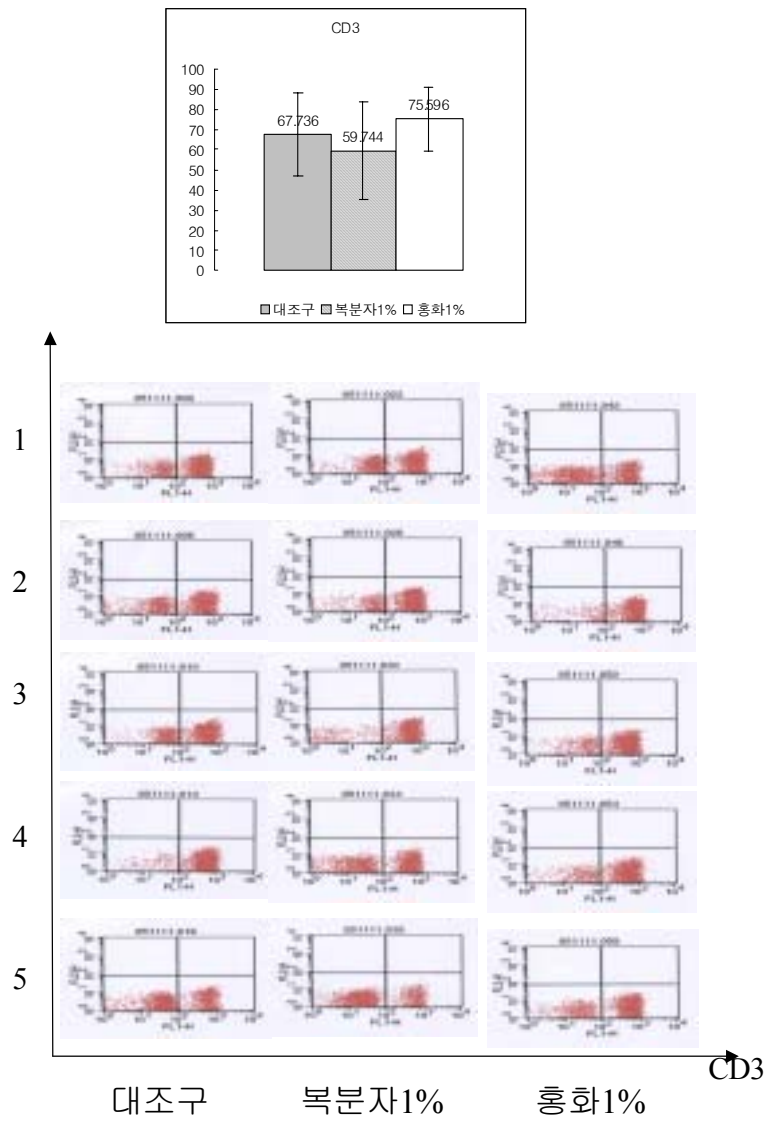


Fig 3.7 FACS 분석을 통한 CD3에 대한 면역세포의 분포도 (처리 후 4주)
 CD3 T cell의 변화는 홍화 1%에서 증가하는 경향은 있으나 유의성은 없다.

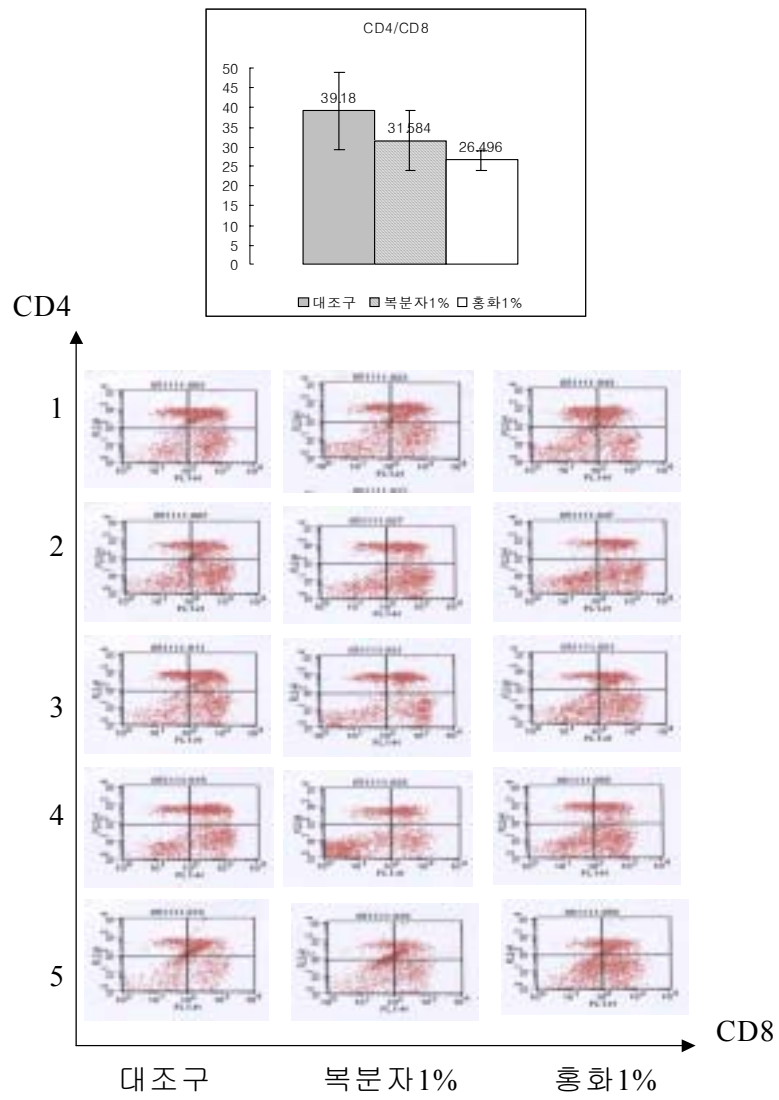


Fig 3.8 FACS 분석을 통한 CD4/CD8에 대한 면역세포의 분포도 (처리 후 4 주)

홍화1%에서 역시 CD4/CD8 T cell이 감소하는 것을 알 수 있다. (p=0.024)

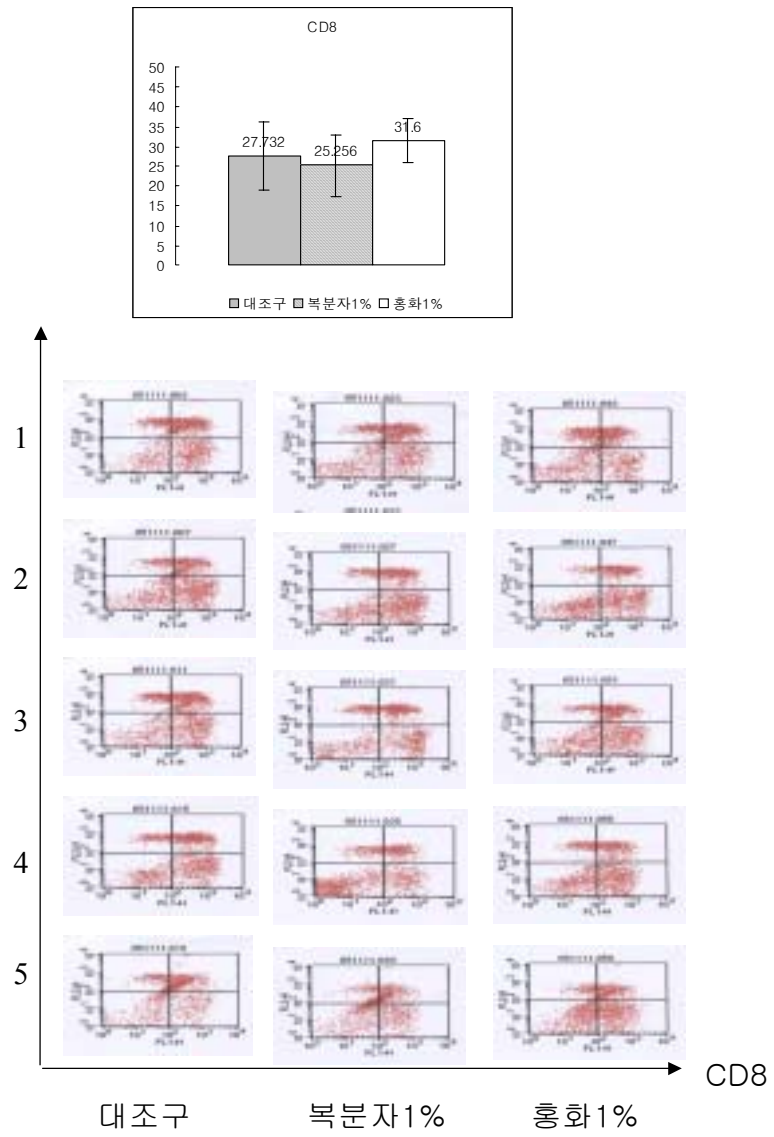


Fig 3.9 FACS 분석을 통한 CD8에 대한 면역세포의 분포도(처리 후 4주)
 홍화 1% 처리그룹에서 CD8 T cell의 증가가 보이는 경향을 보여 주고 있다.

2. 복분자 농도에 따른 실험

사양실험에 사용할 천연물

1차 사양실험에서 복분자와 홍화를 비교했는데 둘 중에 어느 것도 두드러지게 좋은 효능을 나타내지는 않았지만 복분자를 2차 사양실험에 사용하기로 했다. 그 이유는 in vitro 실험에서 면역증강 및 지방세포분화억제에서 복분자가 홍화에 비해 더 확실한 작용을 나타내었고 blood lipid profile도 복분자가 더 좋았기 때문이다.

가 재료 및 방법

실험 A와 같이 시판중인 비육돈 후기 사료에 복분자를 각각 0.5%와 3%씩 함유하게 제조해서 체중 80kg인 암퇘지에게 4주동안 급여했다. 체중, 등지방 두께, blood lipid profile 및 지방조직의 지방합성 및 지방합성관련 효소 activity등을 조사했다.

1) 처리구 설명

대조구(시판 비육돈사료), 복분자 0.5%(비육돈사료에 복분자 0.5% 함유), 복분자 3%(비육돈 사료에 복분자 3% 함유) 3처리를 두고 각 처리당 체중 80kg 암퇘지 5마리 총 15마리를 사용했다.

2) 사료급여

실험 A와 같은 시판사료에 복분자 0.5% 및 3% 함유되도록 제조해서 무제한 급여했다.

3) 여러 조사 항목

실험 A와 똑같은 방법으로 수정했기에 실험 A를 참고하기 바람

나. 결과 및 고찰

Table 3.4에서 보는 대로 복분자의 첨가는 유의차는 없었지만 첨가량에 비례해서 일당증체량이 증가했다. 특히 복분자 3%구는 일당증체량이 1kg가 넘

었는데 개별사양이 아니고 group사양인 점을 감안하면 상당히 높다. 복분자 급여가 일당증체량을 증가 시킨 이유는 확실하지 않은데, 면역증강이 그 이유의 하나로 사료된다. 등지방두께는 개시시와 종료시의 차이가 대조는 7.8mm, 0.5% 복분자는 5mm, 3% 복분자구는 6.8mm 는 복분자 급여구가 등지방두께 증가가 적었다. 복분자 3%구는 종료시 체중이 높은 것을 감안하면 등지방두께 증가가 낮은편이다.

Table 3.4 Effect or concertration of dietary raspberry and safflower on growth performance in the growing pig

	Control ^a	Raspberry ^b 0.1%	Safflower ^c 3%	p value
Initial body wt, kg	81.2±2.41	80.3±2.72	80.8±3.08	p=0.9737
Final body wt, kg	103.4±2.68	105.5±4.04	109.3±3.52	p=0.4953
Average daily gain, kg	0.732±0.089	0.90±0.054	1.017±0.064	p=0.1203
Initial backfat, Cm	10.4±0.97	10.0±0.63	11.0±0.89	p=0.7104
Final backfat, Cm	18.2±2.02	15.0±1.26	17.8±2.13	p=0.4619

Table 3.5에는 각 처리별 혈중 총 cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, 및 triglyceride 농도가 나타나 있다. 복분자 급여량이 높을 수록 대조구에 비해 HDL-cholesterol은 증가하고 LDL-cholesterol은 감소하는 경향을 나타냈다.

Table 3.5 Effect of concentration of dietary rasp berry and safflower on blood lipid profile in the growing pig

	Control 1	Raspberry 0.1%	Safflower 3%	p value
Total cholesterol, mg/dl	87.4±6.36	84.00±3.59	91.4±7.07	p=0.6802
HDL cholesterol, mg/dl	28.8±2.95	31.6±1.36	34.6±1.53	p=0.1851
LDL cholesterol, mg/dl	49.4±4.69	42.4±3.02	43.0±3.49	p=0.3832
Triglyceride, mg/dl	31.6±2.03 a	43.4±3.47 ab	52.4±6.13 a	p=0.0152

Fig 3.10 에는 각 처리구의 사료를 4주 동안 급여하고 난 뒤 등지방조직을 biopsy해서 측정한 지방합성 (lipogenesis)의 결과가 나타나 있는데 예상외로 복분자 3%가 대조구에 비해 높았고 LPL activity도 복분자 3%구가 높았다. (Fig 3.11)

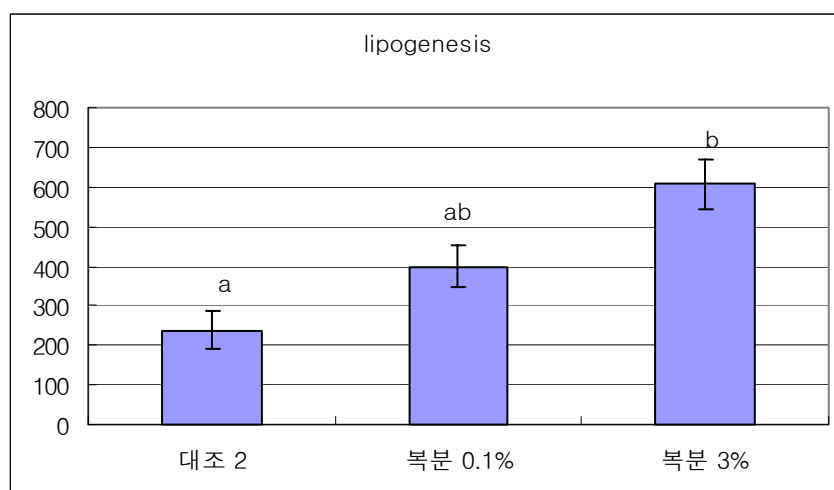


Fig 3.10 Adipogenesis on pig adipose tissue whose feed contain 0.1 percent or 3percent of raspberry during 4weeks.

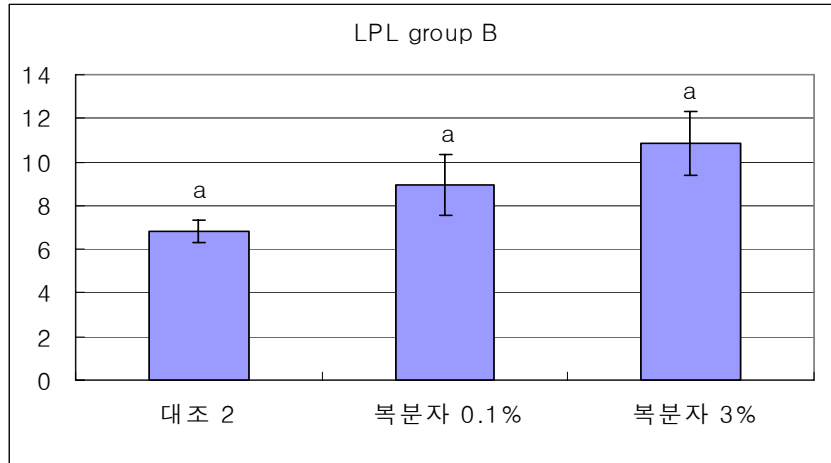


Fig 3.11 The LPL activity of pigs whose feed contain 0.1 percent or 3percent of raspberry during 4weeks.

Fig 3.12에는 복분자 급여가 혈소판응집에 미치는 영향이 나타나 있는데 복분자 급여량이 높을수록 혈소판 응집율이 낮았다. 이 사실은 복분자는 혈소판 응집을 억제하여 혈전을 예방하며 혈행 개선 효과가 있음을 나타냈다.

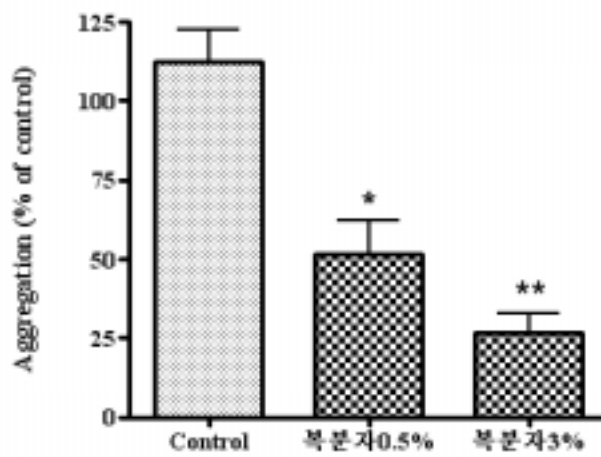


Fig 3.12 Effect of Raspberry administered orally on the collagen-induced platelet aggregation in pig ex vivo

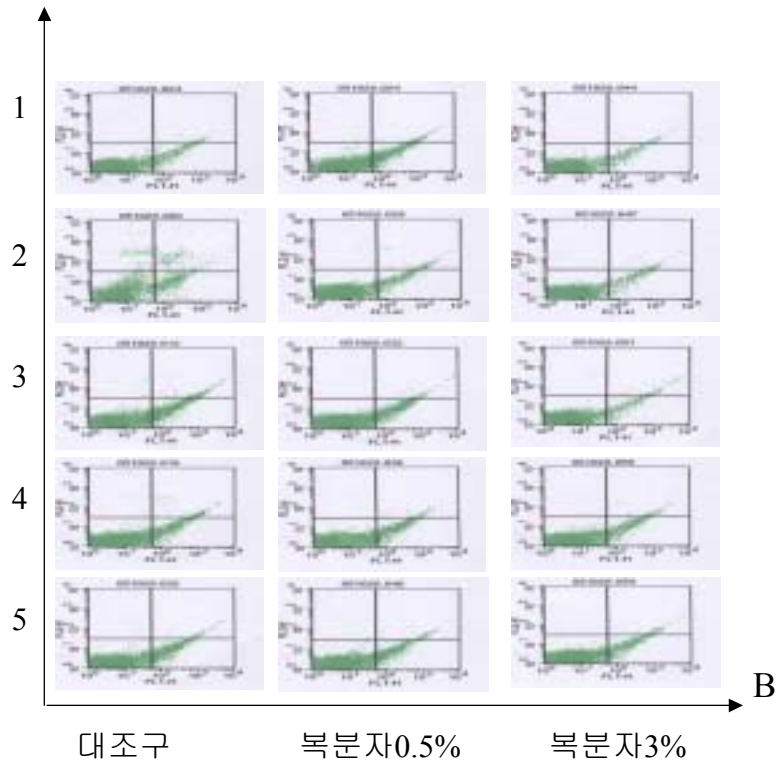
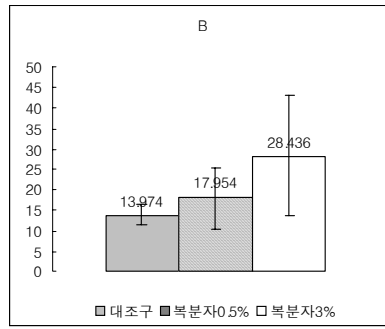


Fig 3.13 FACS 분석을 통한 B에 대한 면역세포의 분포도 (처리 후 2주)

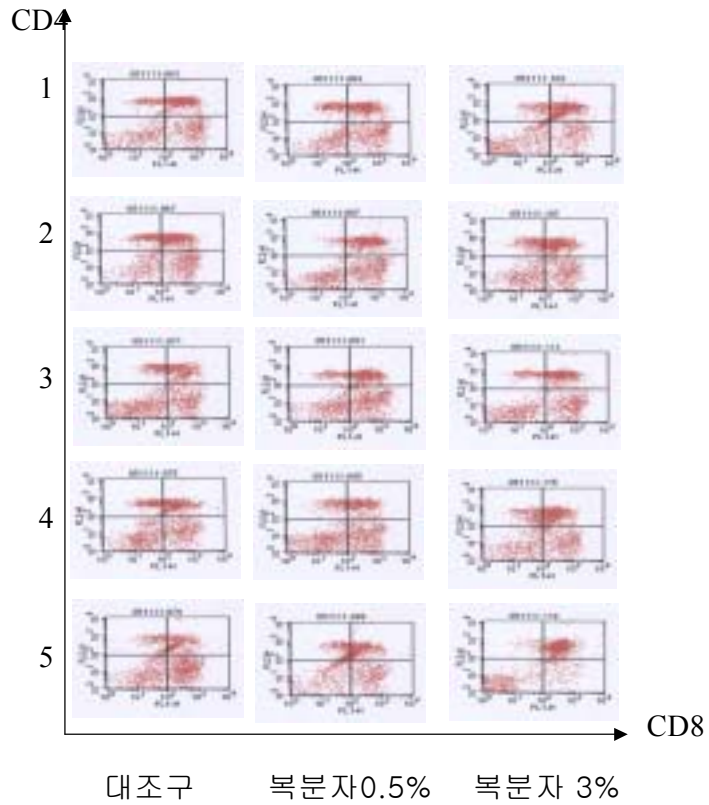
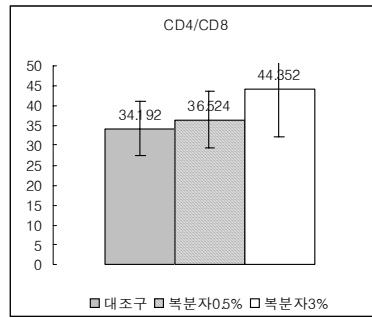


Fig 3.14 FACS 분석을 통한 CD4/CD8에 대한 면역세포의 분포도
복분자 3%에서 CD4/CD8 T cell의 비율이 증가하는 경향을 보여 주었다.

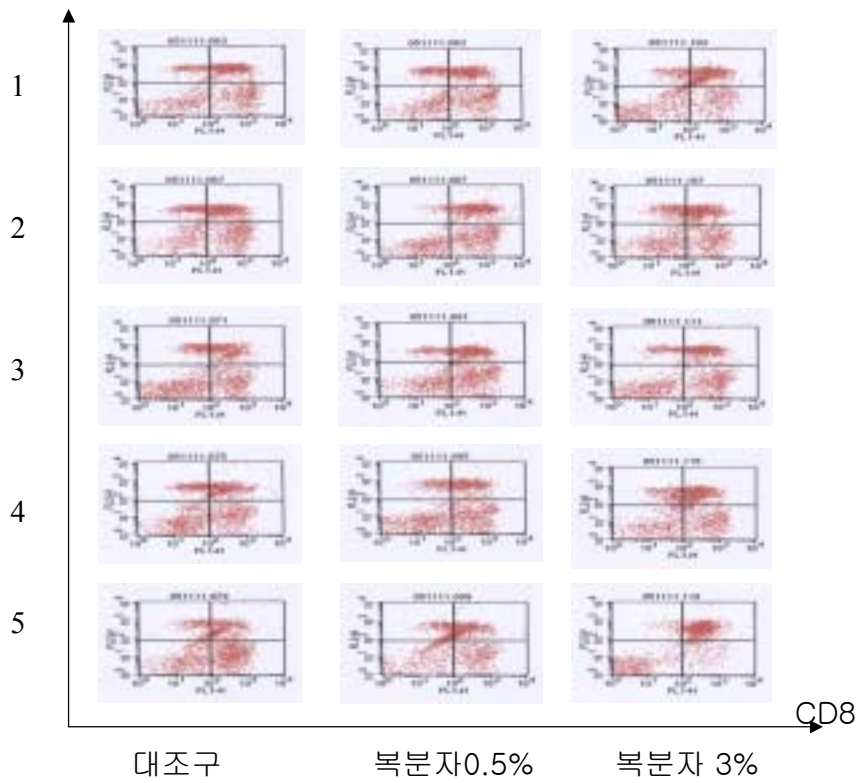
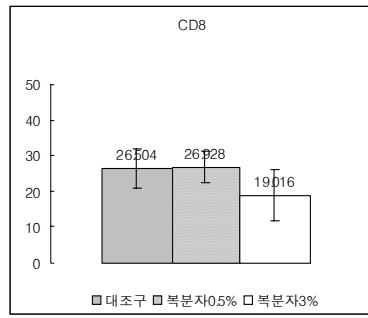


Fig 3.15 FACS 분석을 통한 CD8에 대한 면역세포의 분포도
복분자 3%에서 CD8 Tcell의 비율이 감소하는 경향을 보여 주었다.

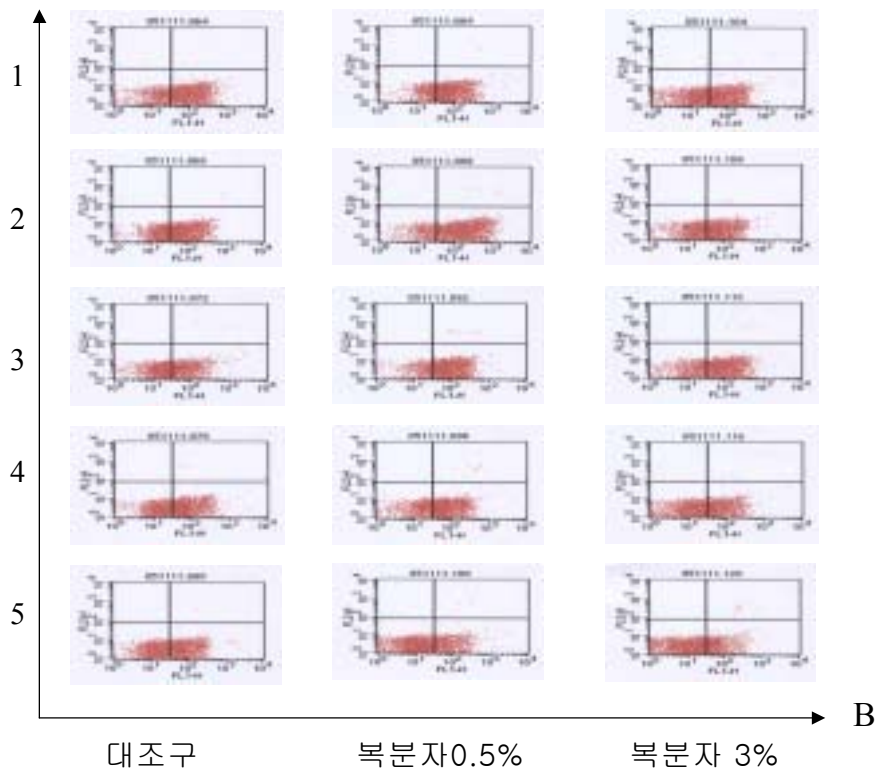
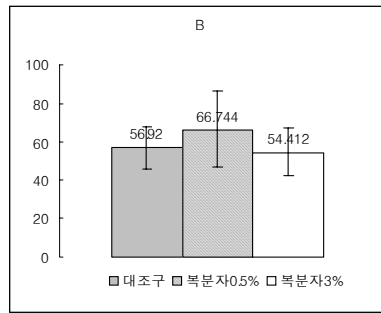


Fig 3.16 FACS 분석을 통한 B에 대한 면역세포의 분포도
 B cell의 비율이 복분자 0.5%dpi 증가하는 경향을 보여주었다.

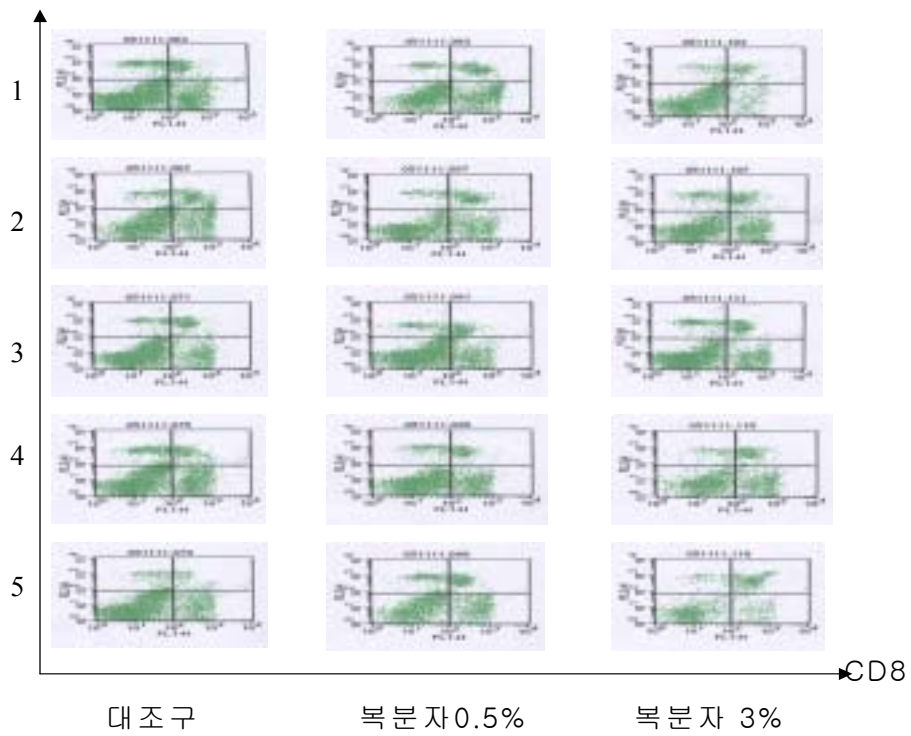
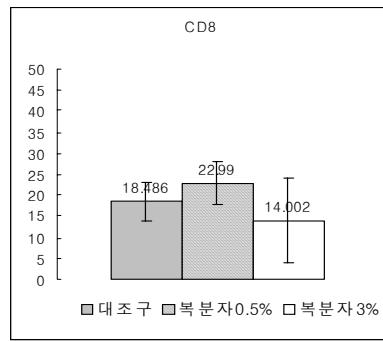


Fig 3.17 FACS 분석을 통한 CD8에 대한 면역세포의 분포도홍화가 돼지 지방진구세포에 미치는 영향 (비림과구 영역)
비임과구영역에서 복분자 3% 처리 시 CD8 T cell이 감소하며 0.5%에서는 증가하는 경향을 보여주었다.

면역세포의 변화를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 보았다.

홍화는 CD4/CD8 T cell의 감소를 유도하는 것으로 생각되며 CD 8 T cell을 증가시키는 것으로 생각된다. 복분자는 임파구 영역에서 CD4/CD8 T cell의 비율이 증가하는 것을 알 수 있었으며 B cell의 비율은 감소하는 것을 보여주었으나 비임파구 영역에서 B cell의 비율이 증가하는 것을 보면 B cell이 활성화 되어 임파구 영역에서 비 임파구 영역으로 전이 된 것으로 생각되어지며 향후 보다 깊은 검증이 필요하다. 복분자와 홍화는 둘 다 면역세포의 증식을 활성화시키는데 복분자가 더욱 강력하며, 활성화 시키는 방법은 다른 것으로 생각된다.



Fig 3. 18 복분자를 처리한 비장세포의 칩 이미지

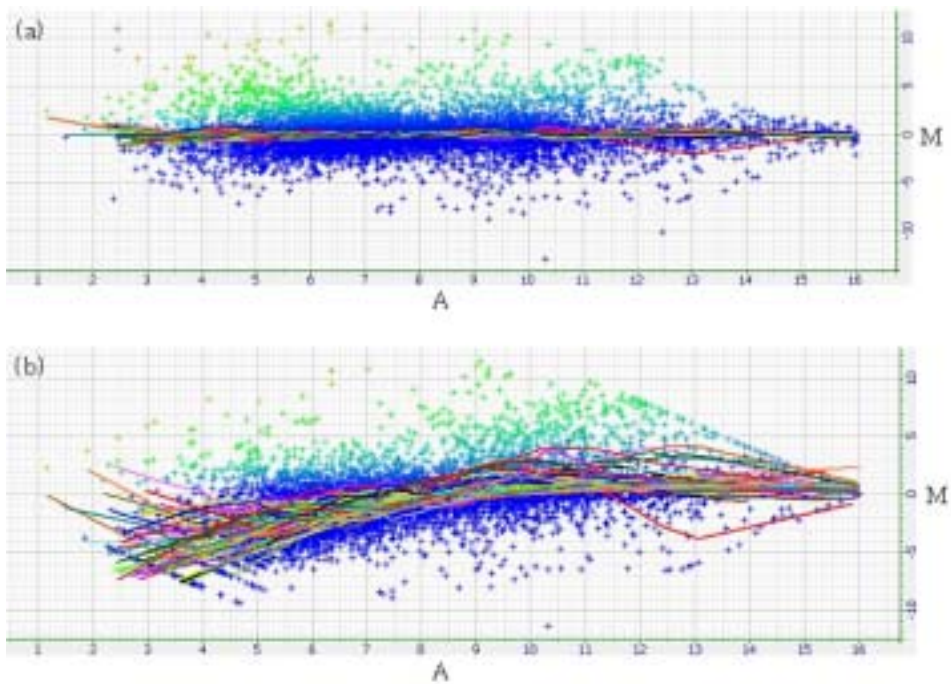


Fig 3. 19 복분자를 처리한 비장세포의 M-A plot (a) M-A plot, (b) Lowess M-A plot

이와 같은 방법으로 data를 보정하였으며 이후에 선별된 유전자를 다음과 같이 정리하였다.

Table 3. 6 복분자를 처리한 돼지비장세포에서 유전자 발현이 2배 이상 증가한 유전자

Gene	Protein DB	Function	ratio
Microtubule-associated protein 4 (MAP 4)	P36225	미세소관의 안정성을 유지하고 중합과정을 촉진	16.11
cytoplasmic dynein heavy chain	BAA97048.1	물질을 microtubule의 - end 쪽으로 이동시키는 역할	4.32
metallothionein isoform [Sus scrofa]	BAA19178	스트레스단백질, 중금속, 항암제등에 의해 유도	2.75
vascular cell adhesion molecule	NP_999056	세포부착단백질, 내피세포가 염증성 cytokine에 의해 활성화되었을 때 발현 증가	2.53
tumour necrosis factor alpha [Sus scrofa]	CAA38693	급성면역반응에 대해 cytokine 분비 유도	2.42
Transcription factor jun-B.	P17275	output signal을 조절	2.35
Mx proteininterferon inducible [Sus scrofa]	NP_999226	large GTPases family, influenza 바이러스 감염 시 항바이러스 상태와 관련	2.06
Lymphotoxin-beta receptor precursor.	P50284	Lymphotoxin-beta는 활성화된 T cell에 의해 생산되며 급성의 염증반응에 관여	2.03
Kruppel-like factor	AAF13295.1	globin 유전자의 발달 조절	2.00

복분자는 급성면역반응에 대해 cytokine 분비 유도하는 tumour necrosis factor alpha 와 influenza 바이러스 감염 시 항바이러스 기능과 관련된 Mx proteininterferon 유전자의 발현을 증가시켜 질병 저항성을 증가시키는 기능을 갖을 것으로 생각된다. 스트레스단백질, 중금속, 항암제등에 의해 유도하는 metallothionein isoform 유전자를 증폭시켜 돼지가 외부 자극에 잘 극복하고 건강하게 자랄 수 있게 도와준다. 또한 세포부착단백질, 내피세포가 염증성 cytokine에 의해 활성화되었을 때 발현 증가를 유도하는 vascular cell adhesion molecule 유전자를 증가시켜 항염증 기능을 가질 것으로 생각된다.

Table 3. 7 복분자를 처리한 돼지비장세포에서 유전자 발현이 2배 이하 감소한 유전자

Gene	Protein DB	Function	ratio
MCM10 homolog	BAB18723	세포분열과 관련	0.48
protegrin	2013229A	포유류 유래 항미생물 펩타이드	0.48
Period circadian protein 1	O35973	neurodegenerative spongiform encephalopathies와 관련	0.45
GTP-binding protein RhoD (Rho-related protein HP1)	O00212	세포골격변화 조절	0.45
ceramide glucosyltransferase	AAK29448.1	glycosphingolipids 합성시 glycosylation 단계에 필요	0.44
L-serine dehydratase (EC 4.2.1.13)	P20132	비산화적 탈아미노반응	0.41
C-X-C chemokine receptor type 4 (CXC-R4)	P56498	호중구를 염증 부위에 끌어들이는 역할 담당	0.39
faciogenital dysplasia protein 2	AAC35430.1	AARSKOG-SCOTT syndrome과 관련	0.38
Leukocyte surface antigen CD53	P19397	transmembrane 4 superfamily에 속함	0.30
osteopontin precursor (AA -16 to 287)	AAA41762	주로 뼈에서 관찰, 석회화와 관련	0.03

포유류 유래 항미생물 펩타이드인 protegrin의 발현을 감소시키고 glycosphingolipids 합성시 glycosylation 단계에 필요한 ceramide glucosyltransferase 유전자의 발현을 감소시켜 지방 대사를 조절 할 것으로 생각된다. 주로 뼈에서 관찰되며, 석회화와 관련된 를 감소시키는 것을 볼때 조골세포활성을 저해 할 것으로 생각이 된다.



Fig3. 20 홍화를 처리한 지방전구세포의 칩 이미지

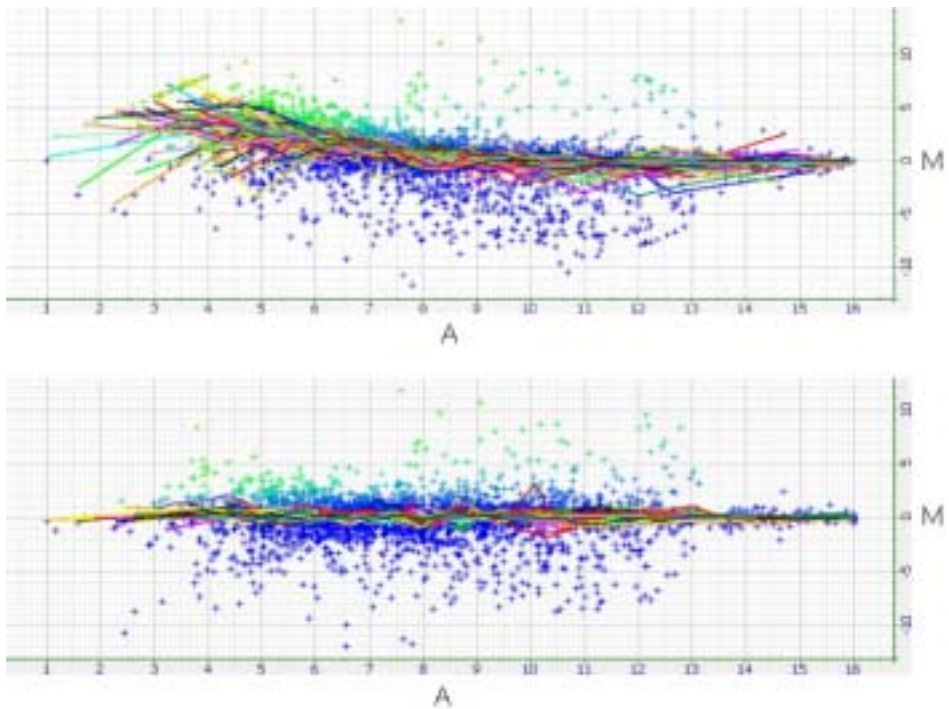


Fig 3. 21 홍화를 처리한 비장세포의 M-A plot (a) M-A plot, (b) Lowess M-A plot

이와 같은 방법으로 data를 보정하였으며 이후에 선별된 유전자를 다음과 같이 정리하였다.

Table 3. 8 홍화를 처리한 지방전구세포에서 유전자 발현이 2배 이상 증가한 유전자

Gene	Protein DB	Function	ratio
phosphorylase kinase gamma subunit [Sus scrofa]	AAC64132	당 신생조절에 이용되는 효소	19.32
Syndecan-1 precursor (SYND1).	P47951	세포표면 proteoglycan ECM의 receptor로 작용	15.11
Thyroglobulin precursor.	P01267	thyroid hormones의 전구체	10.40
cytoplasmic dynein heavy chain	BAA97048.1	물질을 microtubule의 - end 쪽으로 이동시키는 역할	9.39
dynactin 2 (p50)	AAH09468.1	dynein과 mutiprotein complex를 형성	7.09
Microtubule-associated protein 4 (MAP 4)	P36225	미세소관의 안정성을 유지하고 중합과정을 촉진	6.36
NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit mitochondrial precursor	P42028	미토콘드리아의 electron transport chain에서 이용	5.38
amiloride-sensitive epithelial sodium channel gamma subunit	AAK50910.1	aldosterone에 의해 조절, distal nephron에서 발현	3.04
Collagen alpha 1(III) chain.	P04258	collagen 형성, 피부, 뼈, tendon에 존재	2.52
14-3-3 protein epsilon	P42655	세포분열	2.24
centaurin beta	CAC40651	PDGF 보충	2.19
synaptogyrin 1b	CAA05321.1	신경세포에서 presynaptic vesicles과 관련된 integral membrane protein	2.06

홍화추출물을 지방전구세포에 처리한 후 크게 변화가 있는 유전자들 중에서 기능이 알려진 유전자를 정리하였다. 이들 2배 이상 증가된 유전자를 살펴보면 지방 전구세포가 분열을 위하여 증식할 때 관여하는 단백질과 관련이 있음을 알 수 있다. 현재 기능을 모르는 단백질들은 계속 연구 중에 있다.

Table 3. 9 홍화를 처리한 지방전구세포에서 유전자 발현이 2배 이하 감소한 유전자

Gene	Protein DB	Function	Ratio
transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	AAH08615.1	glycolytic pathway, pentose phosphate pathway에 관련	0.48
Electron transfer flavoprotein beta-subunit (Beta-ETF).	P38117	mitochondrial matrix에 존재,	0.48
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Q9R0P9	ubiquitin monomer 생성	0.45
Microsomal glutathione S-transferase 3	O14880	membrane-associated protein	0.42
prostaglandin F synthase	AAG36923.1	생리적 과정에 필요	0.41
CCAAT/enhancer binding protein alpha [Sus scrofa]	AAD19575	지방조직에서 발현되며 체중조절에 중요	0.41
apolipoprotein D	AAG41125	HDL의 일종	0.41
fatty acid-binding protein [Sus scrofa]	CAA67168	lipid transport 조절	0.40
Angiotensinogen precursor	P11859	간에서 생성, 혈압이 낮을 때 renin 분비 자극	0.40
ficolin	NP_999325	collagen domain-containing lectin	0.37
interferon-induced 15K protein precursor	A28304	항바이러스 작용	0.35
salivary lipocalin [Sus scrofa]	NP_998979	extracellular protein	0.30

2배 이하로 감소된 유전자를 살펴보면 pentose phosphate pathway에 관련하여 조절 할 것으로 추정이 되며 prostaglandin 의 생성을 억제하여 심혈관계에 영향을 줄 것으로 생각이 된다. 또한 HDL의 일종인 apolipoprotein D의 발현을 억제시키는 방법으로 지방대사를 조절하고 있다고 생각이 된다. interferon-induced 15K protein precursor 과 같은 유전자를 억제시켜 항바이러스관련 질병 저항시스템을 약화시키는 것으로 추정할 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

아래에 설명한대로 본 연구는 본래 계획한 목표 달성도에 도달했다고 판단된다.

○ 본 연구는 1, 2차년도의 in vitro 실험에 의해 천연물에서 지방축적 조절과 면역활성 증강에 관여하는 방법을 확립하고, 200여 가지 천연물중에서 지방 축적과 면역활성증강에 관여하는 물질을 찾아냈다.

○ 여러 천연물중에서 복분자와 홍화를 돼지 사양실험에 사용했는데 그 이유는 이 두 물질은 면역활성증강을 가져왔고, 지방세포의 분화에 관여했기 때문이다.

○ in vitro 실험에 의해 면역활성을 증강하고 지방세포의 분화를 억제한 복분자를 돼지에게 급여했을 때 등 지방두께가 얇아졌고, 혈중 HDL-Cholesterol 함량은 증가시켰고, LDL 함량은 -Cholesterol 함량은 감소시켰고, 증체량은 향상시키는 경향을 나타내고 CD4/CD8 면역세포를 증가시켰다.

○ 위의 사실은 본 연구에서 확립한 in vitro 탐색방법이 적절했음을 나타내고 복분자를 돼지의 생산성 향상과 지방 축적억제를 위한 사료첨가제로 쓰일 가능성을 보여줬다.

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

본 연구는 지방축적조질과 면역활성을 보이는 물질을 천연물로부터 탐색하여 그 기능을 밝히고 사료첨가물로 개발하고 실용화하는데 목적이 있다. 본 연구를 통하여 지방축적 조절하는 물질을 찾았는데, 복분자는 지방세포분화를 억제하고 홍화는 촉진했다. *in vitro* 실험에 의해서 확인된 효능이 돼지 사양실험에 의해서도 나타났다. 여러 천연물을 조사하여 면역 활성 증강하는 물질을 찾았는데, 그 중에서 복분자의 효과가 가장 좋았으며, 돼지 사양실험에 의해 복분자가 면역세포를 증가시키는 것을 확인했다.

본 연구에서 얻은 결과는, 지방세포의 분화와 면역세포의 기능을 측정하는 실험기술을 확보했기에 이 분야의 발전에 기여할 뿐 만 아니라 복분자의 돼지의 사료첨가제로서의 이용가능성을 보여줬는데 앞으로 국내에서 한약 제조 부산물을 사료로 이용할 수 있는 가능성을 제공해 주었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

지방대사와 면역시스템에 관련된 유전자의 선별을 통해 천연물의 기능을 연구하는데 이용하며 이미 선별된 천연물은 그 기능을 활용하여 특허를 출원하여 국가 경쟁력 확보를 가질 수 있다. 또한 이러한 천연물을 이용하여 주문형 돼지를 생산하는데 활용될 수 있으며 복분자와 같은 천연물은 무항생제 돼지의 생산에 적용하여 최근에 양돈 생산에 문제가 되는 항생제 잔류에 대한 문제를 최소화 하는데 이용이 가능하다. 국내 기술의 세계적 경쟁성 확보와 국내 동물산업의 활성화 및 학문기술 발전에의 기여함으로 본 연구 과제가 활용될 것이다.

제 2 절 활용방안

본 연구는 천연물이용을 우리의 산업과 건강에 활용하는 방법개발에 역점을 두고 추진된바, 천연물 탐색 뿐 아니라 향후 새로운 물질 개발에 적용이 가능하다. 본 기술개발을 모델로 하여 다음과 같은 목적의 연구와 연계시켜 사회·경제적으로 삶의 질을 향상시킬 수 있는 기술을 국내 관련 기관에 이전하고자 한다.

◆ 활용분야

- 가. 맞춤형 축산물 생산을 요구하는 축산 분야
- 나. 무항생제 축산물 생산 분야
- 다. 기능성 사료 또는 식품 개발 분야
- 라. 신의약 개발 분야

제 6 장. 참고문헌

1. Chandler DS, Mynott TL. 1998. Bromelain products piglets from diarrhoea caused by oral challenge with K88 positive enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gut*. 43(2):196
2. Dugenci SK, Arda N, Candan A, 2003. Some medicinal plants as immunostimulant for fish, *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1):99
3. Huang CH, Hong CY, Tsai SK, Lai ST. 2000. Effect of magnolol on coronary vascular resistance in rabbits. measurement with pulsed Doppler velocimetry. *J Formos Med Assoc*. 99(7):554
4. Lee CK, Kim H, Moon KH, Shin KH, 1998. Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials-resistance inhibition of volatile components of Korean aromatic herbs, *Arch Pharm Res*, 21(1):62-6
5. Ling M. Piddlesden SJ, Morgan BP. 1995. A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathway of complement. *Clin Exp Immunol*. 102(3):582
6. Liu F., Kim K. J., Liu X. Q., Li J., and Chen X. 2001. An extract of *lagerstroemia speciosa* L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *J. Nutr*. 131:2242-2247.
7. Noboru Hasegawa. 2001. *Garcinia* extract inhibits lipid droplet accumulation without affecting adipose conversion in 3T3-L1 cells. *Phytother. Res*. 15:172-173.

8. Shen ML, Zhai SK, Chen HL, Luo YD, Tu GR, Ou DW. 1991. Immunomodulatory effect of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on experimental animals. *Int J Immunopharmacol.* 13(5):549
9. Suzuki Y., Unno T., Ushitani M., and Kakuda T. 1999. Antiobesity activity of extracts from *lagerstroemia speciosa* L. leaves on female KK-Ay mice. *J. Nutr Sci. Vitaminol.* 45:761-5
10. Swinnen JV, Veldhoven PP, Timmermans L, Schrijver ED, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Sande TV, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G, 2003. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(4):898
11. Wu SF, Liao CL, Lin YL, Yeh CT, Chen LK, Huang YF, Chou HY, Huang JL, Shaio MF, Sytwu HK. 2003. Evaluation of protective efficacy and immune mechanisms of using a non-structural protein NS1 in DNA vaccine against dengue 2 virus in mice. *Vaccine*,21(25-26):3919
12. Yang J. T., Lee K. S., Kim M. K., Moon S. K., Kang M. K., Park B. H., Kim J. S., and Park J. W. 2004. Effect of *acanthopanax senticosus* on lipoprotein lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother. Res.* 18:160-163.
13. Youn HJ, Noh JW, 2001. *Vet Parasitol*, Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*, 19;96(4):257-63
14. Xavier AR, Garofalo MAR, Migliorini RH, Kettelhut IC, 2003. Dietary sodium restriction exacerbates age-related changes in rat adipose tissue and liver lipogenesis, *Metabolism*, 52(8):1072

15. Zhou L, Yang C, Li J, Wang S, Wu J, 2003. Heptasaccharide and octasaccharide isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and their plant growth-regulatory activity, *Plant Science*, 165(3):571
16. 박구부, 이제룡, 이한기, 박태선, 신태순, 이정일, 김영환, 진상근. 1998. 저장기간에 따른 한약찌꺼기 급여 돈육의 이화학적 특성변화. *한축지*. 40(4):391
17. 박승룡. 1989. 생약 추출물이 생쥐의 *in vitro* 및 *in vivo*의 면역반응에 미치는 영향에 대한 연구. 건국대학교 수의학과 석사학위 논문
18. 정영란. 2001. 일부 한약재가 면역반응 조절에 미치는 영향. 순천대학교 생물학과 석사학위논문.
19. 진상근, 송영민, 박태선, 이정일, 주선태, 박구부. 1999. 한약찌꺼기 급여가 비육돈의 생산형질 및 도체품질에 미치는 영향. *한축지*. 41(3):365