

최 종
연구보고서

참치정소로부터 핵산복합물질의 개발 및
제품화연구

Development and Manufacturing of Nucleic acid
complex from Tuna Spermmary

2001. 12

(주)동원 F&B 식품연구소

농림수산식품자료실



0018145

해 양 수 산 부

최 중
연구보고서

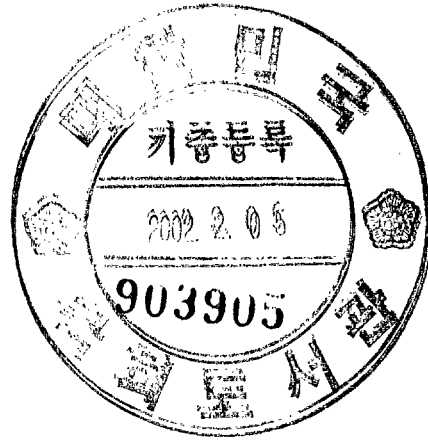
**참치정소로부터 핵산복합물질의 개발 및
제품화연구**

**Development and Manufacturing of Nucleic acid
complex from Tuna Spermmary**

2001. 12

(주)동원 F&B 식품연구소

해 양 수 산 부



제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “참치정소로부터 핵산복합물질의 개발 및 제품화 연구”

과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 12월 20일

주관연구기관명 : (주) 동원 F&B

총괄연구책임자 : 이 승 용

연구 원 : 신 종 현

연구 원 : 송 주 영

연구 원 : 권 오 건

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 강 창 울

위탁연구기관명 : 서울대학교

위탁연구책임자 : 서 영 준

요 약 문

I. 제 목

참치정소로부터 핵산복합물질의 개발 및 제품화 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 환경오염뿐만 아니라 운동부족 및 과도한 스트레스와 같은 육체적·정신적 문제들에 의해 신체의 면역기능이나 저항력이 떨어지고 이로 인한 각종 질병들이 범람하고 있으며, 이러한 질병들이 음식물의 섭취 형태와 깊은 상관관계를 나타내고 있어 질병의 예방과 치료에 음식물이 크게 관여하고 있음을 감안하면 기능성 식품 시장이 매년 급신장하고 21세기에는 이러한 생리활성 물질에 대한 연구가 주류를 이룰 것임은 매우 자명한 일이다. 수산식품은 건강 기능성이 매우 우수한 식품 급원으로서 일부 학자들에 의해 생리활성에 대한 연구가 진행되고는 있지만 산업적으로는 아직도 대부분 부가가치가 낮은 젓갈류, 염건품 및 냉동품등의 형태로 이용되고 있을 뿐이다. 본 연구과제에 이용하려고 하는 참치 정소의 경우도 사실상 활용기술 및 연구가 부족하여 값싼 사료용으로 이용되고 있는 실정인데, 참치는 선망기술의 발달함에 따라 어획량이 매년 비약적으로 증가하여 연간 20만톤 이상이 어획되어 횡감 및 통조림 등으로 이용되고 있으며 이에 따라 버려지는 정소도 상당하여 연간 5천톤 이상이 아깝게 부산물로 버려지고 있다.

분자생물학의 진보에 의해 유전자에 관한 수많은 기술이 개발됨에 따라

생물체의 생식, 성장, 대사 제어에 필수 불가결한 핵산의 생리활성에 관한 연구가 활발해지면서 핵산은 단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 미네랄, 식이섬유에 이은 제 7의 영양소로 주목받기 시작하고 있고 또한 핵산에 대한 생리활성 및 조직학적인 연구도 활발하게 이루어져 섭취된 핵산은 체내에서 세포를 부활시켜 노화를 억제하고, 과산화지질 형성억제 및 면역능을 증가시키고, 장내 균총의 개선작용을 가짐은 물론 화장품의 원료로서 피부보습효과 및 자외선 흡수 효과 등을 가지는 것으로 연구, 보고되고 있다.

현재 일본에서는 화장품 및 건강보조식품의 소재로서 연어정소에서 추출한 핵산을 이용하여 연간 수백억엔대의 시장을 형성하고 있으며 식품으로만 인가되어 있는 핵산을 수술 후 면역력 저하 방지 및 치료 촉진용 의약품으로 실용화하려는 연구가 진행중이다. 이미 중국에서는 핵산이 경구약과 주사약으로 사용되고 있으며, 구미에서는 암 치료 보조용으로 핵산을 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 국내의 경우 핵산에 관한 여러 가지 가능성이 주목을 받게 되면서 유업체에서의 이용을 선두로 몇몇 제약회사 및 화장품 회사 등에서 건강보조식품이나 다이어트 식품, 화장품, 분유 등의 첨가물로 사용하고 있고 점차 그 이용성이 증가하고 있으나 핵산에 관한 연구 및 생산이 전무하여 전량 수입에 의존하고 있다. 또한 지금까지 연구 개발된 핵산의 주 원료가 연어정소에 국한되고 있으며 연어정소의 경우 국내 수급이 어렵고 공급에도 한계가 있어 참치정소에 대한 본 연구가 부산물 활용 측면에서 커다란 기대를 모으고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 전량 부산물로 버려지고 있는 참치의 정소를 대상으로 하여 부가가치를 높여 활용도를 증가시키기 위해 핵산 관련 물질을 분리·정제하는 기술을 개발하고 대량생산의 체계를 확립하며 면역활성 효과, 항산화 효과, 항피로 효과 및 학습능력 향상 효과등의 생리활성을 밝혀 이를 이용한 새로운 기능성 물질을 개발함으로써 다양한 기능을 갖는 식품첨가 원료로서 이용하고 일본에서 수입되는 연어정소에서 추출한 핵산 관련 물질을 대체함은 물론 수출을 모색하여 해양자원의 활용을 증

가시키고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 참치 정소로부터 핵산복합물질을 추출, 분리 및 정제하여 제품화 할 수 있는 기술을 개발하고, 추출된 핵산복합물질을 이용하여 면역능의 증가 효과, 항피로 효과, 학습능력 향상 효과, 항산화 효과등에 대한 생리활성 효과를 in vitro 및 in vivo 실험을 통해 규명할 뿐만 아니라 추출된 제품의 물리·화학적 성질을 파악하고 개선시켜 산업적으로 이용이 가능하도록 생산방법 및 조건을 확립함으로써 면역능을 향상시키고 항산화 및 항피로 효과를 갖는 식품의 원료로서 이용하고, 일본에서 수입되고 있는 연어백자추출물의 대체 물질로 이용하며 나아가 수출까지 가능하도록 개발하는 것을 목표로 하였다.

이와 같은 목표를 달성하기 위해 주관연구기관에서는 국내에서 이용되고 있는 다핵성 어류 중에서 대량 이용되고 부산물이 다량 발생하는 참치 정소를 이용하여 핵산과 단백질이 결합된 핵산복합물질 및 핵산물질과 같은 핵산 관련 물질의 분리·정제방법을 개발하고 핵산함량, 단백질함량, 회분함량, 무기질 조성 및 분자량 분포등의 특성을 조사하여 추출물질의 성분을 파악하고 이를 통해 대량생산을 위한 Scale-up을 실시하여 산업적으로 생산이 가능하도록 하였으며, 참치정소 이외에 다핵성 어종인 대구와 명태 등의 정소를 이용하여 핵산 관련 물질의 추출가능성을 타진하였다. 그리고, 주관연구기관에서는 수행하기 어려운 핵산복합물질의 생리활성 연구에 대해서는 서울대학교 약학대학과 협동 및 위탁연구를 병행하였는데, 협동연구에서는 추출된 핵산복합물질을 이용하여 면역기능 개선에 대한 연구를 실시하였는바 1차년도에서는 복강세포군 및 비장내의 면역기능 개선, 대식세포 활성화 작용을 연구하였고, 2차년도에서는 B 임파구의 활성화, 핵산복합물질의 섭취

가 박테리아 감염에 미치는 영향 및 핵산섭취가 수축된 흰쥐 소장 점막의 회복에 미치는 영향에 관한 연구를 진행하였고 3차년도에서는 양 적혈구에 대한 지연형 과민반응에 관한 연구를 수행하였다. 위탁연구에서는 항피로 및 기억학습능력 향상 효과와 항산화 효과에 대해 연구하였는바 1차년도에서는 항피로 및 지구력 증가 효과 및 기억학습능력 증가효과를 연구하였고, 2차년도에서는 항산화 효과 연구로서 생체내 산화적 손상 보호효과, hydroxyl radical 포착효과, superoxide anion 생성저해 효과, 지질 과산화반응 저해 효과, oxidative stress에 의한 세포사멸 보호 효과 등을 연구하였고, 3차년도에서는 박테리아를 이용한 항돌연변이 효과, 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상 유도 및 보호효과와 더불어 세포배양을 이용한 산화적 세포사멸 및 분자생물학적 작용기전 규명에 관한 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용방안

본 과제의 최종목표는 참치정소로부터 핵산복합물질을 분리·추출하고 이를 산업적으로 이용할 수 있도록 scale-up을 실시하여 대량생산이 가능하도록 생산조건을 설정하고, 이렇게 생산된 추출물의 면역활성 효과, 항피로 및 학습능력향상 효과, 항산화 효과 등의 생리활성을 밝혀 기능성 식품 소재로 이용하는 것이었다. 연구결과를 요약하면 본 과제의 중점개발 목표인 참치정소로부터 핵산복합물질을 추출하는 방법의 경우는 염열수추출법, Alkali Lysis법, 산가수분해법, UF(Ultra Filtration)추출법등을 실험하여 10% 염을 첨가하여 추출하는 염열수추출법과 UF추출법이 최적의 방법으로 선정되었는데, 염열수추출법의 경우 수율은 2.8%로 참치정소 35kg을 이용하여 약 980g 정도의 핵산복합물질을 얻었고 핵산함량은 56.5% 이었으며, UF 추출법의 경우 수율은 약 2.0%로 참치정소 70kg으로부터 핵산복합물질 1.4kg을

얻었고 이 경우 핵산함량은 82.4%로 높게 나타났다.

협동연구로 진행된 면역활성 효과 연구의 경우, ICR 마우스에 핵산복합 물질을 경구 투여한 결과 시료 투여군의 경우 복강 내 세포수가 2배로 증가하였고 다형핵 백혈구가 전체의 2%에서 40%로 증가하였으며, In vivo에서 마우스 비장 내 면역세포에 대한 영향을 비교한 결과 암 이식 초기에 macrophage와 cytotoxic T cell의 비율이 증가하였고 정상 시료 투여군에서도 면역세포가 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 macrophage의 acid phosphatase 활성은 정상 시료 투여군과 암 시료 투여군에서 각각 1.35배, 1.64배로 나타났고 superoxide anion의 분비도 각각 1.27배, 1.28배 증가하였다. BALB/c 마우스에 복강 및 경구 투여한 연구에서는 1차 면역반응에 의한 항원 특이적인 IgM과 IgG 모두 높게 생성되었고, 2차면역 반응에 의한 항체의 생성도 높게 나타났는데 체내에 침입한 박테리아나 바이러스 등의 병원체를 제거하는데 주로 역할을 하는 반응으로 알려져 있는 Th1 반응뿐만 아니라 Th2 반응도 모두 고르게 증가되는 것을 알 수 있었고, 특히 경구투여의 경우 0.1mg 정도의 저농도를 투여한 군에서도 IgG2a와 IFN gamma 등 Th1 반응을 잘 유도할 수 있는 것으로 나타나 박테리아 감염 등에서 면역계가 병원체에 대한 저항성을 높여줄 수 있다는 사실을 알 수 있었으며, 위와 같은 결과들을 바탕으로 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질이 면역 활성 조절 물질로서의 가능성이 있음을 결론지을 수 있었다.

위탁연구로 진행된 항피로 및 지구력 증가효과 연구에서는 중량부하 동물의 유영시간을 측정함으로써 항피로 효과를 검색한 결과 농도 의존적으로 28.7% 증가함으로써 항피로 효과가 있음을 알 수 있었고 영양결핍 동물의 지구력 증가 실험에서는 200mg/kg 투여군에서 53.0% 증가하여 지구력 증가 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 T-미로장치에서의 기억능력 실험을 한 결과 출발지점에서 목적지점까지의 유영시간이 유의적으로 단축됨을 알 수 있었다. 2차 및 3차년도 위탁연구로 진행된 항산화 효과 연구의 경우, 실험 동물을 이용한 생체내 산화적 손상에 대하여 보호효과가 있었으며, 사업화탄

소로 유도된 간 독성 실험에서 최대 50%까지 지질 과산화를 억제시켰다. 또한 deoxyribose assay, trapping assay, NBT assay 등을 이용하여 측정된 결과 농도 의존적으로 hydroxyl radical, superoxide anion을 포착하였으며, hydroxyl radical에 의한 DNA 손상 역시 억제함을 알 수 있었고, 산화적 스트레스 유발물질인 tert-butylhydroperoxide로 유도한 TA102 균주의 mutagenesis를 최대 24%까지 억제하여 항돌연변이 효과를 나타내었다. 세포 배양을 이용한 실험에서도 분화된 HL-60 세포에서의 superoxide anion 생성 저해 및 과산화수소로 유도된 PC 12세포의 산화적 사멸에 대한 보호효과를 나타내었으며, 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상 유도 및 보호효과 연구에서는 SIN-1에 의해 혈장에 생성된 NO(Nitric Oxide)의 양을 약 50% 억제하였고, 지질과산화 및 세포내 환원형 glutathione(GSH) 양의 감소를 억제하여 생체내 산화적 손상에 대해 보호효과를 가짐을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 참치정소로부터 핵산복합물질의 대량생산이 가능한 추출방법이 확립되었고 다양한 생리활성이 밝혀졌으므로 대량생산할 수 있도록 설비를 도입하고 도입된 생산설비를 이용하여 대량생산함으로써 현재 분유 및 우유등의 유제품에 이용되는 연어백자추출물의 대체소재로서 이용할 뿐만 아니라 물성 변화를 통해 시판중인 식음료 제품에 첨가하여 기능성이 차별화된 제품의 첨가제로 이용할 수 있다.

S U M M A R Y

A large amount of a nucleic acid-protein complex was extracted from tuna sperm. The extraction process and effects of this complex on cellular immune responses, anti-fatigue, learning ability and antioxidative activity were investigated in this study. The nucleic acid-protein complex separated by 10% NaCl solution was named DW-DNA, which was composed approximately of 56.5% nucleic acid and 2.8% yield and by ultra filtration was 82.4% nucleic acid and 2.0% yield. As for using modified acid hydrolysis method, the extract was composed of above 89% nucleic acid and 2.2% yield. When fed to ICR mice, DW-DNA increased the number of peritoneal exudate cells by two-folds compared with that in the controls. The ratio of polymorphonuclear leucocyte (PMN) cells infiltrated into the peritoneal cavity increased from 2% to 40% after oral administration of DW-DNA. As for nonspecific immune responses, the acid phosphatase production and superoxide anion secretion by activated macrophages increased by 1.6-fold and 1.3-fold, respectively, in the DW-DNA treated mice compared with the tumor controls. Administration of DW-DNA to the BALB/c mouse increased the first and second antigen specific IgM and IgG. The production of IgG2a and interferon gamma (IFN- γ) in splenocytes culture supernatant was increased by such treatment which indicates Th1 response was enhanced by DW-DNA administration. The anti-fatigue effect of DW-DNA was determined by testing persistence in malnourished mice on a rota-rod and swimming time in weight-loaded rats. The persistence time on the rota-rod increased by 30.7%, 12.2%, and 53% in mice fed DW-DNA at the

concentrations of 50, 100, 200mg/kg, respectively. The swimming time increased significantly ($p < 0.05$) by 15.4%, 21.7% and 28.7%, respectively, in mice fed DW-DNA at the same concentrations. Effects of DW-DNA on antioxidative activity were investigated. CCl_4 -induced lipid peroxidation in rat liver was suppressed to maximum 50% and DW-DNA has hydroxyl radical and superoxide anion scavenging effect. In case of mutagenesis of *Salmonella Typhimurium* TA102 induced by tert-butylhydroperoxide was suppressed to 24%, this shows DW-DNA has anti-mutagenesis effect. The protective effects of the nucleic acid complex from tuna spermary on NO-induced oxidative damage and cell death were investigated. Administration of the peroxynitrite donor 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) (45mg/kg i.p.) increased the levels of serum nitrate/nitrite and PGE₂ (cyclooxygenase end-product), which was attenuated by DW-DNA. In another experiment, DW-DNA inhibited ϕ X174 DNA strand scission induced by the NO donor sodium nitroprusside (SNP). These results indicated that the nucleic acid-protein complex can be mass-produced using ultra-filtration and may act as an immunomodulator, anti-fatigue and antioxidative agent.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Method	21
Chapter 3. Result	43
Chapter 4. Discussion	139
Chapter 5. Reference	141

여 백

목 차

제 1장	서론	17
제 1절	연구개발의 필요성	17
1.	연구개발의 필요성	17
2.	국내·외 관련연구의 현황 및 문제점	18
제 2절	연구개발의 목표 및 연구범위	19
제 2장	연구 방법	21
제 1절	참치정소로부터 핵산물질 및 핵산복합물질의 추출	21
제 2절	핵산복합물질의 규격 및 특성에 관한 연구	22
1.	핵산 함량 분석	22
가.	HPLC를 이용한 정량분석	22
나.	Diphenyl amine 시약을 이용한 분석	23
다.	STS(Schmidt-Thanhauser-Schneider) 분석	23
2.	분자량 분포 분석	23
3.	프로타민 함량 분석	24
제 3절	핵산복합물질의 면역활성 연구	24
1.	체액성 및 세포성 면역에 미치는 영향	24
가.	마우스의 복강세포군에 대한 작용	24
나.	비장세포내 면역세포에 대한 작용	25
다.	대식세포 활성화에 대한 작용	25
2.	세포부활 능력에 대한 연구	27
가.	B 임파구 활성화	27
나.	핵산섭취가 박테리아 감염에 미치는 영향	27
다.	수축된 흰쥐 소장 점막의 회복에 미치는 영향	28
3.	양 적혈구에 대한 지연형 과민반응 연구	29

가. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응의 유도 및 측정	29
나. 지연형 과민반응의 주요 세포 분석	30
다. 지연형 과민반응의 양상 분석	30
라. 지연형 과민반응의 병원균에의 적용	31
제 4절 항피로 및 학습능력 향상 효과에 대한 연구	32
1. 근육의 항피로 효과 연구	32
2. 중량부하 동물의 유영지속 실험	32
3. 격일 절식 동물의 지구력 실험	32
4. T-미로에서의 기억 능력 실험	33
제 5절 핵산복합물질의 항산화 효과에 대한 연구	33
1. 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상에 대한 보호효과	33
가. 사염화탄소 유도에 의한 산화적 손상 보호효과	33
나. NO donor에 의한 산화적 손상 유도	34
다. Nitrite assay	34
라. ALT assay	35
마. 조직내 GSH/GSSG level 측정	35
2. 지질의 과산화 반응에 대한 저해 효과	35
3. Hydroxyl radical에 대한 포착 효과	36
가. Deoxyribose assay	36
나. Trapping assay	38
다. Hydroxyl radical로 유도한 DNA 손상과 이에 대한 보호효과	36
4. NO donor로 유도한 DNA 손상 억제 효과	37
5. Superoxide anion에 대한 포착효과	37
6. Bacteria를 이용한 항돌연변이 효과	37
7. 분화된 HL-60 세포에서의 Superoxide anion 생성 저해 효과	38
8. Oxidative stress에 의한 세포사멸 유도 및 보호효과	38
9. 염증반응 억제 효과	38

10. 세포 배양을 이용한 산화적 세포사멸 보호효과 및 분자	
생물학적 작용기전 규명	39
가. 세포 독성에 대한 보호효과	39
나. apoptosis 유도에 대한 억제 효과	40
다. PARP / Caspase-3 억제 효과 검토	40
제 3장 연구결과	43
제 1절 핵산물질과 핵산복합물질의 추출방법 및 특성에 관한	
연구	43
1. 참치정소로부터 핵산물질 및 핵산복합물질의 최적 추출방법	
연구	43
가. salt의 첨가농도를 달리한 열수추출법에 의한 핵산복합물질의	
추출	43
나. 산 가수분해법에 의한 핵산복합물질의 추출	45
다. Alkali Lysis에 의한 핵산복합물질의 추출	47
라. UF(Ultra Filtration)를 이용한 핵산복합물질의 추출	48
마. 산 가수분해법의 변형에 의한 핵산물질의 추출	50
2. 각 추출방법별 핵산복합물질의 분자량 분포 분석	53
3. 핵산복합물질의 대량생산을 위한 Scale-up 연구	57
가. 보유 공장설비를 이용한 핵산복합물질의 추출	57
나. UF(Ultra Filtration) 임차를 통한 Scale-up	58
제 2절 핵산복합물질의 면역활성 연구	60
1. 체액성 및 세포성 면역에 미치는 영향	60
가. 마우스의 복강내 세포에 대한 작용	60
나. 마우스의 비장내 면역세포에 대한 작용	60
다. 마우스의 대식세포 활성화에 대한 작용	63
2. 세포부활 능력에 대한 연구	66
가. B 임파구 활성화	66

나. 수축된 흰쥐 소장 점막의 회복에 미치는 영향	71
다. 핵산섭취가 박테리아 감염에 미치는 영향	77
3. 양 적혈구에 대한 지연형 과민반응 연구	84
가. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응의 유도 및 측정	84
나. 지연형 과민반응의 양상 분석	86
다. 지연형 과민반응의 주요 세포 분석	92
라. 지연형 과민반응의 병원균에의 적용	92
제 3절 항피로 및 학습능력 향상 효과에 대한 연구	101
1. 근육의 항피로 효과 연구	101
2. 중량부하 동물의 유영지속 실험	101
3. 격일 절식 동물의 지구력 실험	102
4. T-미로에서의 기억 능력 실험	102
제 4절 핵산복합물질의 항산화 효과에 대한 연구	106
1. 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상에 대한 보호효과	106
가. 사염화탄소 유도에 의한 산화적 손상 보호효과	106
나. NO donor에 의한 산화적 손상 유도	106
다. Nitrite assay	109
라. ALT assay	109
마. 조직내 GSH/GSSG level 측정	112
2. 지질의 과산화 반응에 대한 저해 효과	112
3. Hydroxyl radical에 대한 포착 효과	117
가. Deoxyribose assay	117
나. Trapping assay	117
다. Hydroxyl radical로 유도한 DNA 손상과 이에 대한 보호효과	117
4. NO donor로 유도한 DNA 손상 억제 효과	120
5. Superoxide anion에 대한 포착효과	124
6. Bacteria를 이용한 항돌연변이 효과	124

7. 분화된 HL-60 세포에서의 Superoxide anion 생성 저해 효과	127
8. Oxidative stress에 의한 세포사멸 유도 및 보호효과	127
9. 염증반응 억제 효과	132
10. 세포 배양을 이용한 산화적 세포사멸 보호효과 및 분자생물학적 작용기전 규명	132
가. 세포 독성에 대한 보호효과	135
나. apoptosis 유도에 대한 억제 효과	135
다. PARP / Caspase-3 억제 효과 검토	133
제 4장 고찰	139
참고문헌	141

여 백

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

최근 경제성장과 더불어 산업화, 공업화에 따른 환경파괴와 수질오염, 그리고 인스턴트 식품의 범람으로 우리의 건강상태가 극도로 위협받고 있다. 특히 이러한 환경오염 외에도 운동부족 및 과도한 스트레스 같은 육체적·정신적인 문제들에 의해 신체의 면역기능이나 저항력이 떨어지고 환경호르몬과 같은 병원성 물질 등에 의해 인류의 생존 자체가 문제시되는 지경에 도달하고 있다. 또한 이러한 질병들이 음식물의 섭취 형태와 깊은 상관관계를 나타내고 있고 질병의 예방과 치료에 음식물이 크게 관여하고 있음을 감안하면 건강보조식품의 시장이 매년 꾸준히 증가하여 1조원이상의 시장을 형성하는 것은 당연한 일이라 할 수 있다.

수산식품은 건강기능성이 매우 우수한 식품으로 국내 수산가공품 제품은 냉동품, 통조림, 염건품, 냉동식품, 액젓 및 젓갈류 등으로 이용되고 있을 뿐 부가가치가 높은 영양보조식품이나 특수영양식품 등의 연구개발은 거의 전무한 실정이다. 국내 분자생물학적 기술이 이제 세계적이라 할 정도로 비약적인 성장을 나타내고 있는 만큼 수산물에 이러한 최첨단의 기술을 도입하여 새로운 생리활성을 갖는 물질을 개발한다면 국내 기술의 성장은 물론 수산업계의 비약적인 발전을 기대할 수 있을 것이다.

현재 일본에서는 화장품 및 건강보조식품의 소재로서 연어 백자 및 효모등에서 추출한 핵산을 이용하여 연간 수백억엔대의 시장을 형성하고 있으며 식품으로만 인가되어 있는 핵산을 수술 후 면역력 저하 방지 및 치료 촉진용 의약품으로 실용화하려는 연구가 진행중이다. 이미 중국에서는 핵산이 경구약과 주사약으로 사용되고 있으며, 구미에서는 암 치료 보조용으로 핵산을 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

국내의 경우 핵산에 관한 여러 가지 기능성이 주목을 받게 되면서 몇몇 제약회

사 및 화장품회사, 분유업체 등에서 건강보조식품이나 다이어트 식품, 화장품, 분유 등의 첨가물로 사용하고 있고 점차 그 이용성이 증가하고 있으나 핵산에 관한 연구 및 생산이 전무한 실정이어서 대부분 수입에 의존하고 있다. 또한, 지금까지 연구 개발된 핵산의 주원료가 연어, 효모 등에 국한되어 있으며 특히 동물성 원료인 연어의 경우 국내 수급이 어려울 뿐만 아니라 공급에도 한계가 있어 국내에서 이용되고 있는 다핵어종 중 어획량이 많고 부산물이 많이 발생하는 대구, 명태, 참치 등을 연구대상으로 하여 진행하고자 한다. 이들 어종 중에서도 특히 참치는 선망기술이 발달하면서 그 어획량이 비약적으로 증가하여 연간 20만톤 이상의 생산이 이루어지고 있어(해양수산부 어업생산량 통계자료, 1996) 부산물 활용에 커다란 기대가 모아지고 있다. 본 연구과제에 이용하려고 하는 정소부분도 사실상 값싼 사료용으로 이용되고 있는 실정이다.

산업적으로 이용되고 있는 참치의 주요 어종을 살펴보면, Skip Jack과 Yellow Fin으로 이들 어종에는 각각 53.2% 및 53.8%의 수컷이 존재하고, 정소부분이 약 5% 전후로 함유되어 있음을 감안하면 연간 약 5천톤 이상의 자원이 아깝게 값싼 부산물로 버려지는 것이다. 이처럼 특별한 활용기술의 진보가 미약하여 폐기되고 있는 자원에 첨단 분자생물학 기술을 도입하여 고부가가치화 함으로써 자원재활용뿐만 아니라 21세기를 선도할 생물 신소재의 개발은 필수적이라 할 수 있다.

2. 국내·외 관련연구의 현황 및 문제점

분자 생물학의 진보에 의해 유전자에 관한 수많은 기술이 개발됨에 따라 생물체의 생식, 성장, 대사 제어에 필수 불가결한 핵산의 생리활성에 관한 연구가 활발해지면서 핵산은 단백질, 지방, 탄수화물, 비타민, 미네랄, 식이섬유에 이은 제 7의 영양소로 주목받기 시작하고 있다. 미국, 일본뿐만 아니라 프랑스를 위시한 유럽의 많은 국가들은 연어, 청어 등 수산물과 효모 등에서 분자생물학에서 활용되고 있는 방법을 이용하여 핵산을 추출·정제함으로써 각종 용도로 이용하고 있으며, 주된 용도로는 Health Food, 화장품, 의약품 등이다. 프랑스 등 유럽에서는 청어로부터 유래한 핵산을 이용하여 주사용 및 경구투여용 의약품으로 이용하고 있고 중국에서는 주사용으로 이용하고 있으며 일본에서는 연어에서 추출한 핵산을 이용하여 건강식품의 원료로 이용하고 있다. 또한 그 생리활성 및 조직학적인 연구도 활발하게

이루어져, 섭취된 핵산은 체내에서 세포를 부활시켜 노화를 억제하고, 과산화지질 형성억제 및 면역능을 증가시키고, 장내 균총의 개선작용을 가짐은 물론 화장품의 원료로서 피부보습효과 및 자외선 흡수효과 등을 가지는 것으로 연구, 보고되고 있다.

이렇듯 외국에서는 수산물로부터 고기능성 생리활성을 갖는 핵산을 추출, 정제하여 산업적으로 다양하게 이용하고 있으나 국내의 경우 아직 이와 관련된 연구가 이루어지고 있지 않은 실정이며, 원료면에서도 연어 등의 외국에서 주로 이용되고 있는 어종은 국내에서는 수급이 매우 어려워 사실상 이들 원료를 이용하여 핵산을 생산하는 것은 거의 불가능한 실정이다. 국내에서 대량 이용되는 다핵성어종을 살펴보면 참치, 대구, 명태, 정어리 등으로 이들은 대부분 단순 식품용으로 가공, 이용될 뿐이고 특히 핵산의 원료로서 이용될 수 있는 정소부분은 대부분 사료용으로서 값싸게 버려지거나 폐기되고 있다.

국내에서 순수학문으로서의 분자생물학은 비약적인 발전을 거듭하여 이제는 세계적인 수준으로 성장하고 있지만 이를 수산물에 접목시켜 새로운 기능성 물질의 창출에 이바지하는 연구는 전무하여 낙후된 수산업계에 도움을 주지 못하고 있다. 따라서, 핵산의 생리활성 제고뿐만 아니라 이를 응용하는 기술을 개발하고, 값싼 원료를 이용하여 양질의 핵산을 생산함으로써 고 부가가치를 창출하는 것을 목표로 하는 이 연구는 그 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

제 2절 연구개발의 목표 및 연구범위

다핵성 어종의 정소부분으로부터 핵산물질들을 추출, 분리 및 정제하여 제품화할 수 있는 기술을 개발하며 이를 이용한 면역능의 증가 효과, 세포부활에 의한 노화억제 효과, 항피로 및 지구력 증가 효과, 기억학습 능력 증가 효과, 지질대사의 개선효과, 항산화 효과 등에 대한 다양한 생리활성에 대한 효과를 규명한다. 이들 실험결과에 의거하여 그 생리활성이 밝혀지면 물리화학적 성질을 파악하고 개선시켜 산업적으로 이용이 가능하도록 생산방법 및 조건을 확립하여 기능성 식품 원료로써 개발할 것이다. 이와 같은 목적을 달성하기 위해 주관연구기관에서는 국내에 이용되고 있는 어류종에서 대량 이용되고 부산물이 다량 발생하는 참치에 대하여 그 정소부분을 채취한 후 다양한 분리 기술을 접목시켜 핵산복합물질을 추출 및 정

제하고 기본 규격을 설정하며 추출물의 핵산함량, 기타 성분별 함량 및 분자량 분포 등을 분석하여 물리·화학적 특성을 규명하며 이를 위해 아직 정립되지 않은 핵산성분등에 관한 분석방법을 확립한다.

이와 병행하여 주관연구기관에서는 수행하기 어려운 핵산복합물질의 면역기능 개선 효과 연구, 항피로 및 지구력 증가 효과 연구, 기억 학습능력 증가 효과 연구, 항산화 효과 연구 등의 생리활성에 대한 연구를 협동 및 위탁연구를 통하여 수행함으로써 추출물에 대한 활용방안 및 이용성을 극대화시킨다.

제 2 장 연구 방법

제 1절 참치정소로부터 핵산물질 및 핵산복합물질의 추출

1. 시료 전처리

다핵성 어종이면서 국내에 다량 이용되어 부산물이 대량으로 발생하는 어종인 참치의 정소를 채취하고 깨끗하게 수세한 후 냉동시켜 운반하여 냉동고에 보관하면서 핵산복합물질 및 핵산물질의 추출 시료로 이용하였다.

2. 핵산물질 및 핵산복합물질의 추출

어류의 정소부분에 함유되어 있는 핵산복합물질을 추출하기 위하여 국내·외에서 생리활성 물질에 대한 추출법으로 이용되는 Alkali lysis법, 산가수분해법, 염열수추출법 뿐만 아니라 신기술로 주목받고 있는 한외여과 (Ultra Filtration)법을 이용하여 최적의 추출방법을 선정하였다.

Alkali Lysis법에 의한 추출은 Tris-SDS로 세포막을 분해한 후 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 ethanol을 이용하여 핵산성분을 분리한 후 여과 및 감압건조를 실시하여 핵산복합물질을 정제하는 분자생물학에서의 연구방법을 응용하여 추출하였다. 또한 이 방법을 응용하여 SDS와 같은 알칼리 물질 대신 HCl과 같은 산을 이용하여 추출하는 산가수분해법을 진행하여 핵산복합물질을 추출하였다. 염열수추출법은 SDS등 화학시약을 가급적 배제시키고 농도별로 염용액을 첨가한 후 가열하여 추출하는 방법이며 한약재나 해조류 등에서의 일반적인 신물질 추출 시 이용하는 방법으로 널리 이용되는데 본 실험에서는 이 방법을 응용하여 농도별로 NaCl을 첨가하여 혼합한 뒤 일정시간 가열하여 세포안에 존재하는 핵산 성분들을 추출한 후 원심분리 및 여과 공정을 거쳐 얻은 맑은 상등액에 ethanol을 첨가하여 핵산 침전물을 얻고 정제공정을 가해 순도를 높인 후 건조 및 분쇄하여 핵산복합물질을 생산하였다. 한외여과법은 현재 공업용수 제조나 공업제품 등의 분리에 활발히 이용되고 있고 여러 수처리 및 막분리에 의한 생리활성 물질의 추출 등에 주목받고 있

는 신기술로서 이를 응용하여 본 공정에 적용하였는데 먼저 냉동 보관중인 정소를 해동시킨 후 마쇄하고 10% NaCl 용액을 첨가하여 가열 분해한 뒤 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액의 점도를 낮추기 위해 알칼리 처리 및 중화를 실시하고 나서 Molecular Weight Cut Off (MWCO) 크기별 한외여과막을 이용하여 분리하고 건조 및 분쇄하여 핵산복합물질을 추출하였다.

위와 같은 방법으로 어류의 정소로부터 핵산물질 및 핵산복합물질을 추출하여 각각의 추출물에 대한 수율, 핵산함량, 기타성분함량 및 분자량등을 분석함으로써 최적의 추출방법을 선정하였다.

3. 핵산복합물질의 대량생산을 위한 Scale-up

실험실에서 확립된 최적의 추출방법을 바탕으로 본 연구과제의 최종 목표인 산업적 대량생산을 위한 Scale-up 연구를 위해 공정별 Scale-up parameter를 설정하고 생산현장에서 직접 실험을 진행하였다. 먼저 생산공정을 간략하게 나타내면, 고농도의 염용액과 chopping한 어류정소를 혼합하여 가열등의 방법으로 핵산복합물질을 추출하는 추출공정과 추출물에 혼입되어 있는 불순물이나 기타 성분들을 제거하기 위한 여과공정, 원하는 성분만을 충분히 농축시키는 농축공정과 농축된 추출물을 저장성 및 유통성이 뛰어나도록 건조시키고 분쇄하는 건조 및 분쇄공정으로 나눌 수 있는데 이를 위한 각각의 parameter들을 설정하였고, 본 연구의 참여업체인 (주)동원 F&B의 참치캔 생산공장인 창원공장에서 자체 보유중인 설비만을 이용하여 생산하였고, 더불어 UF system을 임차하여 생산하는 2가지의 Scale-up 연구를 진행하였다.

제 2절 핵산복합물질의 규격 및 특성에 관한 연구

1. 핵산함량 분석

가. HPLC를 이용한 정량 분석

약 100mg의 시료를 정밀히 달아 test tube에 넣고 20ml의 10% NaCl 용액 및 1.0N NaOH를 첨가한 후 boiling water bath에서 2시간 동안 증탕가열하여 추출하고

나서 방냉 후 이 추출물을 증류수를 이용하여 200ml로 정용하였다. 추출한 시료 3ml를 test tube에 넣고 100mM 인산완충액 (pH 5.3) 4ml와 0.01M ZnCl₂ 1ml 및 0.01% nuclease P1 용액 2ml를 넣은 후 60℃ water bath에서 2시간 동안 반응시켰다. 방냉 후 증류수를 이용하여 10ml로 정용하고 0.45μm filter로 여과하여 이 여과물을 HPLC에 주입하여 표준물질로 미리 작성한 표준곡선과 비교하여 정량하였으며, 핵산의 총량은 dAMP, dTMP, dCMP, dGMP 각각의 deoxyribonucleotide를 합하여 계산하였다.

나. Diphenyl amine법

핵산복합물질의 DNA 함량을 Giles와 Meyer에 의해 보완된 Burton의 방법에 따라 분석하였다. 먼저 70% Ethanol 또는 Petroleum ether로 재결정하여 정제한 diphenyl amine 1g을 glacial acetic acid 100ml에 녹여 진한 H₂SO₄ 2.75ml를 가하여 시약을 제조한 후 시료용액 2ml에 동량의 diphenyl amine 시약을 가하여 100℃에서 10분간 가열한 다음 냉각해서 생성되는 spectrum을 595nm에서 측정하였으며 표준물질과 비교하여 정량하였다.

다. STS(Schmidt-Thanhauser-Schneider)법

잘 분쇄한 시료 약 400mg을 정확히 칭량하여 냉각수 8ml를 가해 냉각하면서 균질화시킨 후 1ml를 취해 10% Perchloric acid(PCA) 2.5ml를 첨가하여 원심분리한 뒤 침전물은 한번 더 추출하여 모은 상등액을 가용성 획분으로 하였다. 이후 침전물은 EtOH : Ether(1 : 1)로 추출하여 지방을 추출하고 남은 잔사에 0.3N KOH 2.0ml를 18시간 반응시키고 6N HCl과 60% PCA를 반응시켜 원심분리하여 얻은 상등액을 RNA 획분으로 하였다. 남은 잔사에 5% PCA를 첨가하여 90℃, 15분간 반응시키고 원심분리하여 얻은 상등액을 DNA 획분으로 하였다. 이들을 파장 260nm의 spectrophotometer상에서 측정하여 얻은 흡광도값을 이용하여 정량하였으며 총 핵산량은 가용성 획분, RNA 획분 및 DNA 획분의 합으로 계산하였다.

2. 분자량 분포 분석

추출된 핵산복합물질의 대략적인 분자량 분포를 분석하기 위해 일반적으로 널리 이용되는 Gel Permeation Column(GPC)을 이용한 분석법을 실시하였다. 일정한 유속을 유지시키고 재현성 있는 결과를 도출하기 위해 Bio-Rad사의 Automated Econo

System을 사용하였는데 Peristaltic pump와 resin으로는 Sepharose CL-6B를 이용하였고, 70cm(length) × 20mm(i.d)의 column과 50mM Tris-HCl (pH 7.0, 150mM NaCl)을 eluent로 이용하여 0.5ml/min의 유속으로 분석하였다.

3. 프로타민 함량 분석

시료 약 150mg을 정밀히 달아 질소정량법 중 Semimicro-Kjeldahl법을 이용하여 분석하였다. 시료를 분해 플라스크에 넣고 분해촉진제를 첨가한 다음 분해가열장치에서 가열하였다. 냉각 후 50 ~ 100ml의 탈이온수를 가하여 희석시키고 정용하고 나서 시료분해액 10 ~ 50ml를 채취하여 중화용 NaOH 용액을 20 ~ 40ml 주입한 후 약 10 ~ 15분간 증류하였다. 발생된 NH₃를 0.05N 산 표준용액으로 적정하고 나온 값을 다음식에 따라 함량을 구하였다.

0.1N 황산 1ml = 1.4007mg N

$$\text{함 량(\%)} = \frac{\text{질소량(mg)} \times 3.19}{\text{검체의 채취량(mg)} \times \frac{100 - \text{건조감량(\%)}}{100}} \times 100$$

제 3절 핵산복합물질의 면역활성 연구

1. 체액성 및 세포성 면역에 미치는 영향

가. 마우스의 복강세포군에 대한 작용

Maeda 등의 방법에 따라 복강내 세포 수를 측정하였다. 4-5주령의 ICR 마우스 (♂, 20 - 25 g)를 정상 대조군과 DW-DNA를 투여한 정상 시료 투여군으로 나누었으며, 각 군마다 12마리씩 사용하였다. 시료 50mg/kg/day을 웅성 ICR 마우스에 1회 경구 투여한 후 1, 2, 4 및 7일에 실험동물을 경추 탈구법으로 희생시키고 복강을 빙

냉 PBS로 세척하여 복강내 세포(peritoneal exudate cell, PEC)를 모았다. 4,000 rpm에서 3분씩 3회 원심세척하고 얻은 세포에 PBS용액 10ml씩을 가하여 총 복강내 세포 수를 hemocytometer로 세었다. 상기의 복강내 세포액을 4°C, 4000rpm에서 3분간 원심분리하여 cell pellet을 얻고 이를 0.1ml PBS에 현탁시켜 slide glass상에 도말, 건조시켰다. 건조된 도말 표본을 absolute methanol로 고정한 후 Giemsa 염색시약(ICN biomedical Inc.)으로 2-3분간 염색하였다. 95% ethanol로 탈색하고 건조시킨 후 현미경으로 관찰하였다. Differential white cell count를 시행하여 PMN, lymphocyte, monocyte의 3종을 100%로 하여 각 세포간의 비율을 백분율로 나타내었다.

나. 비장세포내 면역세포에 대한 작용

ICR 음성 마우스를 정상 대조군(N군), 정상 시료 투여군(NS군), S180세포(5×10^5 cell/mouse)를 서혜부에 피하 이식한 암 대조군(T군) 및 암세포를 이식하고 시료를 투여한 암 시료 투여군(TS군)의 4군으로 나누었으며, 각 군마다 20마리의 마우스를 사용하고 N군과 NS군에는 PBS를, T군 및 TS군에는 S180세포를 이식하고 24시간 후 부터 시료 50mg/kg/day를 1일 1회 10일간 연속적으로 경구투여 하였다. 암세포 이식 후 제 7, 14, 21 및 28일에 각 실험군마다 4마리씩 비장을 적출하였다. 비장세포 10 μ l에 FITC-conjugated rat anti-mouse Ig 항체 10 μ l와 FACS staining buffer (1% BSA, 0.1% tween 20, 0.02% Na₃N) 80 μ l를 가하고 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 원심분리해 상등액을 제거한 후, cell pellet을 fixing solution (1% p-formaldehyde, 0.88% NaCl) 100 μ l와 PBSN 600 μ l에 현탁해 flow cytometer(Becton Dickinson Inc., USA)로 형광 강도를 측정하였다.

CD4⁺ T 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD4 antibody (Serotec Ltd.)로 분석하였으며, CD8⁺ T 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD8 antibody (Serotec Ltd.)로, macrophage의 표면항원인 Mac-1은 FITC-conjugated rat anti-mouse Mac-1 antibody (Serotec Ltd.)로, 그리고, B 임파구는 FITC-conjugated rat anti-mouse CD19 antibody (Serotec Ltd.)로 분석하였다.

다. 대식세포 활성화에 대한 작용

DW-DNA가 macrophage의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 활성화된

macrophage로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. ICR 웅성 마우스를 정상 대조군(N군), 정상 시료 투여군(NS군), 암 대조군(T군) 및 암 시료 투여군(TS군)의 4군으로 분류하였다. 각 실험군마다 5마리의 마우스를 사용하였다. N군과 NS군에는 PBS를, T군 및 TS군에는 S180세포를 이식하고, 24시간 후부터 N 및 T군에는 생리식염수를, NS 및 TS군에는 시료 50mg/kg/day을 매일 1회 5일간 경구투여하였다. 최종 시료 투여일로부터 5일째 되는 날 마우스를 경추 탈구법으로 희생시키고 PBS용액 5ml를 복강 내에 투여하여 가볍게 마사지한 다음 주사기로 복강세포를 2회 반복 회수하였다. 복강 세포를 4,000rpm에서 3분간 3회 원심 세척하고 tissue culture dish에 1×10^6 cell/ml이 되도록 가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양 후 plate에 부착되지 않은 세포는 PBS 용액으로 세척하여 제거하고 부착된 macrophage만을 취하였다. 상기에서 얻은 macrophage에 0.1% Triton X-100을 100 μ l를 가한 다음 0.02M *p*-nitrophenyl phosphate/0.1M citrate buffer(pH 5.0)를 0.5ml 가해 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 1,500rpm에서 5분간 원심분리 후 얻은 상징액에 4°C 상에서 0.2M borate buffer(pH 9.8) 1ml씩 가하여 반응을 종결시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다. Macrophage의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Acid phosphatase activity } (p\text{-nitrophenol } \mu\text{mol}/10^6\text{macrophage}/60\text{min}) \\ & = 1.15 \times \text{OD } 405\text{nm} \end{aligned}$$

한편, macrophage의 활성화 여부를 알아보는 또 다른 지표로서 활성화된 macrophage로부터 분비되는 superoxide anion(이후 SOA라 칭함)의 양을 측정하였다. 즉, 상기의 방법으로 얻은 macrophage에 10mM glucose, 80 μ M ferricytochrome C 및 0.2mg/ml opsonized zymosan을 함유한 PBS 용액을 1.5ml 가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 90분간 배양한 후 1,200rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상징액을 냉시험관에 옮겨 반응을 종결시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Macrophage로부터 유리된 SOA양은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{SOA } (\text{nmol}/10^6 \text{ macrophage}/90\text{min}) = 15.87 \times \text{OD at } 550\text{nm}$$

2. 세포부활 능력에 대한 연구

가. B 임파구 활성화

BALB/c 마우스를 경추 탈구법에 의하여 치사시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄하고 얻은 세포 부유액을 원심분리하였다. RBC를 제거하기 위하여 pellet을 RBC lysis buffer에 넣고 37도에서 5분동안 반응한 후 washing하여 주었다. B lymphocyte만을 얻기 위해 complement mediated cytotoxicity(CMC) 방법을 이용하였다. 단핵구의 splenocyte suspension을 얻은 후 미리 준비해 둔 hybridoma culture supernatant를 넣고 4℃에서 1시간 동안 반응하였다. 사용된 hybridoma들은 J1j.10 (anti-Thy1.2 mAb), F4/80 (anti-Macrophage), GK1.5 (anti-CD4), 3.168 (anti-CD8), PK136 (anti-NK cell), 33D1 (anti-Dendritic cell)이고 이들을 culture하고 적당한 시기에 supernatant를 얻어 4도에서 보관하였다가 사용하였다. 한시간 후 cell을 1500rpm에서 5분간 원심분리 하여 harvest하고, 여기에 rabbit complement 1 bottle(Cedarlane)을 10ml의 cytotoxicity medium에 넣어 녹인 후 0.45um filter로 여과하여 cell pellet에 넣어 suspension 상태로 만들었다. 이렇게 처리된 cell을 37℃에서 30분간 반응하여 T cell, Macrophage, Natural killer cell, Dendritic cell을 제거하였다. Hemocytometer를 이용하여 cell을 카운팅한 후 1×10^6 /well이 되도록 희석하여 96well round bottom plate에 culture하였다. sample을 4,000ug/ml부터 2배씩 dilution하여 15ug/ml까지 희석하여 48시간, 72시간 배양하며 각각의 well에 [methyl-³H] thymidine sp. act. 2uCi 씩을 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 마지막 6시간동안 배양하였다. Multicell harvester에 glass membrane filter를 끼워 탈이온수를 가해 일정하게 적신 후 배양한 세포 반응액을 filter 위에 가하고 free [methyl-³H] thymidine이 완전히 제거될 때까지 여러 번 세척한 후 각각의 filter를 vial에 넣고 완전히 건조시켰다. Lumagel용액을 2ml씩 가하여 투명하게 녹은 반응액을 β liquid scintillation counter로 측정하였다.

나. 핵산섭취가 박테리아 감염에 미치는 영향

시료를 1mg/0.5ml 0.1mg/0.5ml, 10mg/0.5ml 또는 1mg/0.25ml의 농도가 되도록

섭씨 60℃에서 PBS buffer에 각각 녹였다. 다섯 마리의 female BALB/c 마우스를 한 군으로 하여 경구투여군의 마우스에는 1mg/0.5ml의 시료를 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 복강투여군의 마우스에는 1mg/0.25ml의 시료를 0.25ml씩 이틀간격으로 다섯 번 복강주사 하였다. 대조군에는 0.25ml의 PBS를 같은 방법으로 복강주사 하였다. 마지막으로 투여한지 3일 후에 모델항원인 Ovalumin (OVA) solution을 20ug/마우스의 농도로 complete Freund's adjuvant (CFA)에 1:1의 비율로 유탁하여 복강주사 하였다. 10일 후에 capillary를 이용하여 채혈하였고 serum을 얻은 후에 ELISA 방법을 이용하여 OVA에 특이적인 항체를 측정하였다. OVA 500ng/well을 96well ELISA plate에 coating한 후 1% BSA blocking buffer로 150ul/well씩 넣고 실온에서 30분간 blocking 하고, 0.1% BSA dilution buffer로 serum을 여러 농도로 dilution한 후 100ul씩 well에 넣고 4℃에서 overnight 반응 하였다. 각각의 plate를 Goat-anti-mouse IgG1-AP, Goat-anti-mouse IgG2a-AP를 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응하였다. Plate를 PBS로 여러번 washing한 후에 alkaline phosphatase 효소의 substrate인 pNPP를 넣어 발색을 확인하고 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. IFN gamma의 정량은 비장세포를 이용하였다. 경추탈골법으로 치사한 마우스에서 비장세포를 얻고 이를 OVA가 100ug/ml 인 배양액에서 72시간동안 배양하였다. 72시간 후 상층액을 harvest하고 상층액 중의 cytokine 측정은 sandwich ELISA법을 사용하였다.

다. 수축된 원위 소장 점막의 회복에 미치는 영향

시료를 투여한 군의 serum을 얻은 후 OVA에 특이한 IgG의 정량을 위해서 OVA로 여러 번 면역화한 마우스의 serum을 immunoaffinity column을 이용하여 정제한 polyclonal anti-OVA antibody를 1000ng/ml부터 2배씩 희석하여 standard로 사용하였다. 각각의 plate를 Goat-anti-mouse IgM-AP, Goat-anti-mouse IgG-AP를 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응하였다. Plate를 PBS로 여러번 washing한 후에 alkaline phosphatase 효소의 substrate인 pNPP를 넣어 발색을 확인하고 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 항원 OVA에 대한 T cell의 반응성을 알아보기 위하여 이들 군의 마우스로부터 spleen을 얻어 T cell proliferation assay를 실시하였다. BALB/c 마우스를 경추 탈구법에 의하여 치사시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄하고 나서 얻은 세포 부

유액을 원심분리하였다. RBC를 제거하기 위하여 pellet을 RBC lysis buffer에 넣고 37°C에서 5분 동안 반응한 후 washing하여 주었다. 세포수를 5×10^5 cells/well이 되도록 맞추어 96well round bottom plate에 넣고 OVA solution을 최종농도가 500, 100, 20ug/ml 혹은 0이 되도록 넣어주고 96시간동안 배양하였다. 배양 중 최후 18 시간은 ^3H thymidine을 넣어 배양하였고, 세포를 automatic harvester를 이용하여 harvest 하였다. T cell proliferation은 각 well에서 동위원소의 incorporation 정도를 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

3. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응 연구

가. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응의 유도 및 측정

시료의 경구투여가 양적혈구에 의해 유도된 지연형 과민반응에 미치는 영향을 알아보하고자 6주령의 female BALB/c 마우스를 사용하였다. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 하여 시료를 1mg/0.5ml의 농도가 되도록 60°C에서 PBS buffer에 각각 녹여 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 대조군의 마우스에는 PBS를 0.5ml씩 경구투여 하였다. 투여한 지 5일 후에 양적혈구를 100ul씩 intradermal injection하였다. 또다른 대조군으로 intradermal 주사와 같은 부위에서 subcutaneous 주사를 동시에 실시하였다. 양적혈구 주사 후 24시간 48시간 72시간에 각각 주사 부위의 swollen 부피를 측정하였다. 지연형 반응이 DW-DNA의 용량에 의존적으로 잘 일어나는지를 알아보기 위하여 위와 같은 실험을 용량을 달리하여 비교하였다. 시료를 0.1mg, 1mg, 10mg/0.5ml PBS에 잘 녹인 후에 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 대조군의 마우스에는 PBS를 0.5ml씩 경구투여 하였다. 투여한 지 5일 후에 양적혈구를 100ul씩 intradermal injection하였다. 또다른 대조군으로 intradermal 주사와 같은 부위에서 subcutaneous 주사를 동시에 실시하였다. 양적혈구 주사 후 24시간 48시간 72시간에 각각 주사 부위의 swollen 부피를 측정하였다. 지연형 과민반응의 양상을 비교하기 위하여 항원에 대한 체액성 면역 반응을 조사하였다. 양적혈구를 filter plate에 50ul/well씩 96well ELISA plate에 coating한 후 1% BSA blocking buffer로 150ul/well씩 넣고 실온에서 30분간

blocking 하고, 0.1% BSA dilution buffer로 dilution된 serum을 100ul 씩 well에 넣고 4℃에서 overnight 반응하였다. 각각의 plate를 Goat-anti-mouse IgM-AP, Goat-anti-mouse IgG-AP를 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응한 뒤 alkaline phosphatase 효소의 substrate인 pNPP를 넣어 발색을 확인하고 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 지연형 과민반응의 주요세포 분석

지연형 과민반응의 주요 세포를 분석하기 위하여 시료를 투여하고, 투여한 지 5일 후에 양적혈구를 100ul씩 intradermal 주사하였다. 주사한지 72시간 후에 주사 부위에 swollen을 확인하고 마우스를 경추탈골법으로 치사한 후 swollen 부분을 절개해 내고 mesh로 잘 갈아서 Ficoll-Hypaque 용액을 이용하여 단핵구만을 분리하였다. 분리된 세포를 flow cytometer를 이용하여 세포를 분석하였다. 분석시 사용되는 hybridoma들은 J1j.10 (anti-Thy1.2 mAb), F4/80 (anti-Macrophage), GK1.5 (anti-CD4), 3.168 (anti-CD8), PK136 (anti-NK cell), 33D1 (anti-Dendritic cell)이고 이들을 culture하고 적당한 시기에 supernatant를 얻어 4℃에서 보관하였다가 사용하였다. 이중에 지연형 과민반응에 주요한 세포로 알려져 있는 대식세포(Macrophage)를 분리하였다. 이렇게 분리된 Macrophage의 세포표면에 발현되어 있는 여러 molecule을 flow cytometer 방법으로 분석하였다. 분석대상 Molecule의 선정은 activation marker인 CD40, CD54, CD80, CD86, MHCII로 하고 이것들에 대한 biotinylated antibody(Pharmingen)를 넣어 1시간동안 4℃에서 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 avidin-FITC(Pierce)를 넣고 4℃에서 30분간 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 pellet에 paraform aldehyde를 넣어 fixing시키고 나서 Facs tube로 옮겨 PBS로 희석한 뒤 Flow cytometer로 분석하였다.

다. 지연형 과민반응의 양상 분석

양적혈구에 대한 세포성 면역반응의 정도는 비장세포 proliferation assay와 cytokine assay로 평가하였다. 양적혈구를 투여한 지 7일 후에 비장세포를 얻어 5×10^5 /well 혹은 5×10^6 /well이 되도록 배양하였다. 배양액에 양적혈구로 자극시켜 주며 배양하고, 최종 20시간동안 ^3H Thymidine로 pulse하여 96시간 후 세포를 수확

하고 proliferation 정도를 beta-counter를 이용하여 측정하고 배양 72시간 후에 상등액을 얻어 cytokine assay에 사용하였다. 상층액 중의 cytokine 측정은 sandwich ELISA 방법을 사용하였다. 먼저 항 IL-4 단클론 항체를 1mg/ml로 희석하여 96-well plate에 100ml/well로 coating하여 4°C에서 overnight incubation 하였다. 0.05% Tween-20-PBS(Showa Chemicals INC.)로 3-5회 세척하고, 비특이적 결합을 막기위해 1% BSA 를 200ml/well로 37°C에서 1-2시간 blocking하였다. 0.05% Tween-20-PBS로 3-5회 세척하고 측정하고자 하는 시료를 적정한 비율로 희석하여 각 well에 50-100 ml씩 분주하여 실온에서 2시간 또는 4°C에서 overnight incubation하였다(dilution buffer: 0.1%BSA in 0.05% Tween-20-PBS). 0.05% Tween-20-PBS로 3-5회 세척하고 Biotinylated anti-IL4 Ab를 dilution buffer로 1mg/ml로 희석하여 100 ml/well씩 분주한 후 실온에서 2시간 동안 방치한 후, 0.05% Tween-20-PBS로 6회 세척하였다. Streptavidin-HRP (Pharmingen, 13047E)를 dilution buffer로 1:1000으로 희석한 후 100 ml/well씩 분주한 후 37°C에서 30분간 방치하였다. 0.05% Tween-20-PBS로 6회 세척하고 OPD 1T (SIGMA, P-6912) + Phosphate citrate buffer (SIGMA, P-4809) 14.7 ml + H2O2 (SIGMA, H-1009) 7.35 ml (차광) 용액을 각 well당 100 ml씩 분주한 후 30분간 반응시켰다. 12.5% 황산을 50ml/well씩 분주하여 반응을 중지시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다 (Microplate Leader: Molecular Devices, THERMO max). 표준시료로는 제조합 IL-4를 희석하여 표준농도 곡선을 얻은 다음 정량하였고, IFN-gamma, IL-2등의 cytokine도 같은 방법으로 정량하였다.

라. 지연형 과민반응의 병원균에의 적용

핵산복합물질의 섭취가 지연형 과민반응을 일으키는 병원균의 미치는 영향을 알아보기 위하여 위와 같은 방법으로 대식세포를 분리한 후 '가'와 같은 방법으로 시료를 투여하고, 투여한 지 5일 후에 양적혈구를 100ul씩 intradermal 주사하였다. 주사한지 72시간 후에 주사 부위에 swollen을 확인하고 이 부위에 intracellular pathogen으로 알려진 *Listeria monocytogenes*를 수를 다양하게 하여서 주사하여 감염시키고 감염시킨 지 2시간 후에 swollen 부위를 절개하여 내고, 주입하였던 pathogen의 수를 Giemsa staining을 통하여 카운팅하였으며 다음과 같은 방법으로 계산된 값을 분석하였다.

% surviving organism = {counted pathogen in treated mouse / counted pathogen in untreated mouse} X 10

제 4절 항피로 및 학습능력 향상 효과에 대한 연구

1. 근육의 항피로효과 연구

근육 항피로 효과의 측정은 mouse를 실험동물로 하여 Worsoff 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 100cm(길이)×50cm(폭)×50cm(높이)의 수욕상으로부터 10~12cm 높이로 동물을 거꾸로 고정시키고, 피로가 최대가 되어 머리가 물속에 잠기는 시간을 측정하여 피로 감지시간으로 하였다. 시료를 2일간 투여하고, 다음날 다시 투여하고 14℃로 유지한 수욕에서 30분 후에 실험하였다. 1군을 8마리로 하고 시료는 실험착수 30분 전에 경구투여하고, 대조군에는 부형제만을 투여하였다. 대조약물로는 단백동화 스테로이드제인 oxymetholone을 사용하였다.

2. 중량부하 동물의 유영지속 실험

Miura 등의 방법에 따라서 실시하였다. 즉, mouse의 꼬리에 체중의 5%에 해당하는 물체를 부하시키고 유영실험을 실시하였다. 즉, 수온을 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하고 시료는 1일 1회씩 2일간 및 실험 30분전에 경구 투여한 다음, mouse를 수중에 넣어 자유롭게 유영시키고, 물 속에 10초간 가라앉을 때까지의 시간을 측정하였다. 1군 8마리를 실시하고, 대조군에는 부형제만을 투여하였다. 대조약물로는 단백동화 스테로이드제인 oxymetholone을 사용하였다.

3. 격일 절식 동물의 지구력 실험

격일간 2회 절식한 mouse에 2일간 시료를 투여하고, 다음날 시험 시작 30분전에 투여하여 Dunham 등의 방법에 따라 rota-rod 장치에서 실험하였다. 회전 속도는 35rpm으로 하여 동물을 선별 한 후, 40rpm에서 실험을 실시하여 rod위에서 떨어질 때까지의 시간을 측정하였다. 대조군에는 부형제만을 투여하였다. 대조약물로는 단백동화 스테로이드제인 oxymetholone을 사용하였다.

4. T-미로에서의 기억 능력 실험

물로 충전한 다중 T-미로 장치를 이용하여 Sato 등의 방법에 따라서 실시하였다. 즉, T-미로장치는 120cm의 폭 및 50cm 깊이의 T-미로장치를 이용하여 23±1℃의 물을 채우고 mouse를 직선 코스에서 1일 5회 3일간 유영시키고, T-미로에서 1일 5회 3일간 T-미로의 출발지점(S)에서 유영을 시작하여 목적지(G)까지의 유영 시간을 측정하고 무효지점으로의 실수 회수를 측정하였다. 시료는 매 실험 전 30분에 경구투여하고 1군을 6마리로 하며 대조군에는 부형제를 경구투여하였다. 대조약물은 중추신경 자극제인 caffeine을 사용하였다.

제 5절 hexan복합물질의 항산화 효과에 대한 연구

1. 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상에 대한 보호효과

가. 사염화탄소 유도에 의한 산화적 손상 보호효과

시료의 in vivo 항산화 활성을 검토하기 위한 연구의 일환으로 생체 내 지질의 과산화에 대한 억제 효과를 검토하였으며, 이와는 별도로 간독성 지표를 동시에 측정하였다. 체중 150-200g 내외의 웅성 Sprague-Dawley rat을 실험동물로 하여 조직의 산화적 손상(oxidative damage)을 유발하는 대표적 독성 화학물질인 사염화탄소를 0.6mL/kg 용량으로 복강 내 투여하여 간 조직에서의 지질의 과산화를 유도하였다. 참치정소로부터 분리한 hexan복합물질 50mg/kg/day은 미리 1, 3, 5일 동안 경구로 투여하였고, 이후 사염화탄소를 복강 내로 투여한 뒤 하루 동안 절식시킨 후 간을 적출 하였다. 0.15M KCl로 10%(w/v) 간 균질액(homogenate)을 만든 후 원심분리하여 (800g, 10분) 상등액을 얻었다. 간 균질액(0.5mL)에 1ml 10% trichloroacetic acid (TCA)를 가하고 10분간 방치 후 원심분리 (1,000g, 2분)하여 상등액 1ml을 취하고, 0.5% thiobarbituric acid (TBA) 0.5ml을 가한 뒤 100℃에서 10분간 가열하였다. 상온에서 식힌 후 532nm에서 흡광도를 측정함으로써 생성된 malondialdehyde를 정량하였다. 한편, 사염화탄소 투여 24시간 후 동시에 복대 동맥으로부터 채혈하여 간독성의 지표인 amino transferase(AST 및 ALT) 활성을 측정하였다. 복대 동

맥으로부터 얻어낸 혈액을 실온에서 30-60분 동안 방치한 뒤 원심분리하여 (3,500 rpm, 10분) 상등액을 취하였다. AST, ALT 기질 0.5ml을 37°C에서 2분 동안 가온한 뒤 상등액 0.1ml을 가하여 37°C에서 AST의 경우 60분, ALT의 경우 30분간 반응시켰다. 이후 발색액 2,4-DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) 0.5ml을 가하고, 실온에서 20분간 방치하였다. 0.4N NaOH 5ml을 가하고 충분히 혼합하여 실온에서 30분 동안 방치 한 뒤 520nm에서 흡광도를 측정하여 비교하였다.

나. NO(Nitric Oxide) donor에 의한 산화적 손상 유도

체중 200g 내외의 웅성 Sprague-Dawley rat을 실험동물로 하여 nitric oxide donor (NO donor) 를 i.v.로 투여하고 생체내에서 산화적 손상을 유발하였다. 실험 동물은 5개의 그룹으로 나누며, 정상군에는 생리식염수를, NO donor를 투여하는 군에는 0, 1, 3, 5일동안 미리 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질 (50mg/kg/day)을 경구로 투여하였다. 혈액은 헤파린을 처리한 주사기로 복대동맥으로부터 얻어내며, 실온에서 30분동안 방치하여 coagulation 시킨 뒤 3,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 한편, 별도로 간을 적출하여 homogenation buffer (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES)로 10%(w/v)의 간균질액(homogenate)를 만든 후 2000g에서 5분동안 원심분리하여 상등액을 얻었다.

다. Nitrite assay

실제 NO는 oxygen 존재 하에서 빠르게 nitrite 및 nitrate를 생성을 하게 되는데, nitrite를 포함하는 시료와 Griess reagent (2% sulfanilamide in 5% phosphoric acid 5ml, 0.2% naphthyl ethylene diamine in 5% phosphoric acid 5ml)를 1 : 1로 반응시키면 chromophoric azo derivative를 생성하며 이를 측정함으로써 생성된 NO의 양을 간접적으로 측정할 수 있다. 분리한 혈장 (50ml)을 de-proteinizing buffer (DDW 140 ml, 30% ZnSO₄ 30 ml)에 가하고 실온에서 15분간 반응시켜 단백질을 제거하였다. 2,000g에서 10분동안 원심분리하여 상등액을 취하여 동일한 부피의 Griess reagent를 가하고 실온에서 10분동안 반응시켰다. 반응 산물은 540-570nm에서 흡광도를 측정하고, 단백질량을 정량하여 그 값을 보정하였다.

라. ALT assay

NO donor로 유도된 산화적 조직손상을 측정하기 위하여, 간독성의 지표로 가장 많이 사용되고 있는 amino transferase (ALT 또는 AST)의 활성을 측정하였다. 분리한 혈장 100ml을 incubation mixture 500ml (DL-alanine, a-ketoglutaric acid in phosphate buffer)에서 30분간 반응을 시킨 뒤 발색액 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH)을 가하고 실온에서 20분간 방치하였다. 0.4N NaOH를 가하고 30분 후 sodium pyruvate를 표준물질로 하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 조직내 GSH/GSSG level 측정

환원형 glutathione (GSH)은 간조직에 mM 정도의 농도로 존재하고 있으며, 이는 강한 환원력을 가지고 있어 radical scavenger로 작용하는데 항산화 방어 기작에서 중요한 역할을 한다. 또한 GSH는 여러가지 효소의 보조인자로서의 역할을 하고 있으며, 외부 독성물질의 무독화 과정에도 중요한 역할을 한다. NO는 생체내에서 산화적 손상을 유발하여 GSH pool을 고갈시킨다고 알려져 왔으며, 이러한 NO를 제거함으로써, 조직손상을 보호 할 수 있으리라 기대 된다. 본 실험에서는 glutathione assay kit (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 간조직의 GSH/GSSG level을 지시한 방법에 따라 측정하였다.

2. 지질의 과산화 반응에 대한 저해 효과

Rajakumar와 Rao의 방법에 따라 150-200g의 웅성 Spraque Dawley rat의 뇌를 분리하여 0.15M KCl로 10%(w/v)의 뇌 균질액을 만든 후 원심분리하여 (800g, 10분) 상등액을 취해 실험에 사용하였다. 반응액에 KCl(0.15M), 뇌 균질액(300ml), 여러 용량의 시료를 첨가한 후 Fe(III), ascorbic acid 각각 0.1mM 첨가하여 과산화 반응을 개시시키고 37°C의 항온수조에서 20분간 유지한 후, 차가운 TCA용액 (5.5%, 500 μ l)과 TBA 용액 (2% in 0.05M NaOH 500 μ l)을 넣어 반응을 종결시키고, 끓는 물에 15분간 방치하여 발색시켰다. 이 최종 반응 산물을 상온에서 식히고 원심분리한 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Hydroxyl radical에 대한 포착 효과

가. Deoxyribose assay

Aruoma의 방법을 따라 시료의 hydroxyl radical 포착효과를 알아보았다. 반응 용액 1ml에 potassium phosphate buffer (10mM, pH 7.4), deoxyribose (2.8mM), 과산화수소(2.8mM), EDTA(0.1mM)에 착화합물화 시킨 ferric chloride (0.02mM) 그리고 ascorbic acid (0.1mM)을 첨가하여 항온수조에서 37°C, 1시간 동안 반응하였다. TCA(5.6%) 50 μ l, TBA(2% in 0.05M NaOH) 500 μ l를 첨가하여 반응을 종료시킨 후 100°C의 물에 15분간 가열하여 발색시켰다. 이 반응 용액을 상온에서 식히고 원심 분리한 후에 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. Trapping assay

Prasad와 Laxdal의 방법을 이용하여 시료의 hydroxyl radical 포착효과를 검토하였다. potassium phosphate buffer(0.1M, pH 7.5), 과산화수소(10mM), salicylic acid (0.5mM) 여러 농도의 시료를 첨가하여 이 반응용액을 germicidal UV lamp 하에서 (거리 50cm) 1시간 동안 노출시키고 1,200rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액을 분리하여 syringe filter (Millipore, Millex LCR 13mm, 0.45 μ m)로 거른 후 바로 HPLC로 분석하였다. 분석조건으로는 C₁₈ 역상컬럼 (Waters Nova-pak)에 80%의 citric acid (0.03M), acetic acid buffer (0.03M, pH 3.6)와 20%의 ethanol을 농도구배 없이 0.8ml/min의 양으로 흘려주며, 자외선 검출기를 이용하여(315nm) 반응 산물인 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA)와 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA)를 검출하였다.

다. Hydroxyl radical로 유도한 DNA 손상과 이에 대한 보호효과

과산화수소와 자외선을 이용하여 hydroxyl radical을 생성시켜 ϕ X174(RFI) DNA에 손상을 유도하였으며, 이 때 시료를 넣어 DNA 가닥 절단에 대한 보호효과를 관찰하였다. 반응용액 30 μ l 안에 Tris-EDTA buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0), DNA (0.3 μ g), 과산화수소 (250mM)를 첨가한 후 조건에 따라서 germicidal UV lamp로 15분간 조사한 후 loading buffer를 넣어 반응을 종결시켰다. 이 반응산물

을 ethidium bromide가 들어있는 0.8% agarose gel에서 70V로 1시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동을 마친 후 UV transilluminator로 가시화한 후 polaroid 사진기로 촬영하였다.

4. NO donor로 유도한 DNA 손상 억제 효과

NO donor 유도한 DNA 손상은 super coiled ϕ X174(RFI) double-strand DNA가 circular 형태, 더 나아가 linear 형태로 변하는 것을 관찰함으로써 측정하였다. 이때 각각의 반응 용액에 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질을 농도별로 넣어 DNA 가닥 절단에 대한 보호효과를 관찰하였다. 반응용액 20ml 안에 10mM Tris-HCl (pH 7.4), ϕ X174 DNA (0.3mg), NO donor (500mM), 여러 농도의 시료를 첨가한 후 37°C incubator에서 30분간 반응시키고, 이후 loading buffer (100mM EDTA, 0.1% bromphenol blue tracking dye, 50% (v/v) glycerol)를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응산물을 ethidium bromide가 들어있는 0.8% agarose gel 상에서 70V로 1시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동을 마친 뒤 UV transilluminator로 가시화한 후 polaroid 사진기로 촬영하였다.

5. Superoxide anion에 대한 포착효과

Xanthine oxidase에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원법을 이용하였다. 반응용액 1ml 안에 phosphate buffer(0.1M pH 7.8), xanthine(0.1mM), NBT(0.6mM), xanthine oxidase (0.05 unit), 여러 농도의 시료를 넣어 25°C에서 10분간 반응시키고 곧바로 560nm에서 흡광도를 측정하여 superoxide anion에 대한 포착효과를 비교하였다. 예비실험을 통해 대상 시료가 xanthine oxidase를 직접 저해하지 않고, NBT를 환원시키지 않는 것을 확인하였다.

6. Bacteria를 이용한 항들연변이 효과

활성산소종에 민감하게 반응하는 *Salmonella typhimurium* TA102를 이용해 시료의 항들연변이 효과에 대해 조사하였다. 반응용액 (700 μ l) 안에 조건에 따라 각각의 시료를 녹인 PBS 500 μ l, nutrient broth에서 배양한 TA102 균주 100 μ l, 들연변이 유발원인 *tert*-butylhydroperoxide 용액 100 μ l을 첨가 한 후 37°C에서 40분간

반응하였다. 이후 45°C의 top agar (2ml)를 부은 후 잘 섞어서 최소 한천 배지에 깔고 48시간 동안 항온 incubator(37°C)에서 배양시켰다. 배양 후 돌연변이의 균집수를 세어 항돌연변이 효과를 검색하였다.

7. 분화된 HL-60 세포에서의 Superoxide anion 생성 저해 효과

세포를 0.5×10^6 cells/ml의 농도로 키운 후 1.3%의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하고 6일간 5%, CO₂ incubator에서 배양하여 세포분화를 유도한 후 실험에 사용하였다. 세포 배양액을 원심분리하여 배지를 제거하고 PBS를 첨가하여 현탁시켰다. CO₂ incubator에서 10분 동안 preincubation 한 후 TPA(8 μM), cytochrome C(60 μM)를 첨가하여 30분 동안 반응시켰다. 이 반응산물을 -20°C 냉동고에서 10분간 방치하여 반응을 종결시킨 후 550nm에서 흡광도를 조사하였다. 공반응에서는 세포를 제외시키며, 시료의 첨가량에 따라 공반응을 시행하여 측정치를 보정하였다.

8. Oxidative stress에 의한 세포사멸 유도 및 보호효과

과산화수소를 PC12 세포에 처리 후 일정시간 간격으로 세포사멸의 형태학적 변화를 phase contrast microscope을 이용하여 관찰하였다. 별도의 실험에서 MTT assay를 이용하여 세포성장 억제를 정량적으로 측정하였다. 이를 위해서 PC12 cell을 1×10^4 cells/well의 밀도로 poly-D-lysine으로 코팅된 48-well dish에 깔고, DMEM 85%, FBS(fetal bovine serum) 5%, HS(horse serum) 10%에서 이를 동안 배양한 후 과산화수소를 N₂ defined media (DMEM, F12, N₂ supplement, sodium pyruvate)에서 12시간 동안 처리하였다. 이후 여기에 1mg/ml 농도의 MTT solution을 2시간 동안 배양하고 20% sodium dodecylsulfate 와 50% dimethylformamide로 용해시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

* MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) solution

9. 염증반응 억제 효과

NO 및 그 대사물은 proinflammatory prostaglandin (PG) 생성 및 COX-2 발현의 조절을 매개함으로써 염증반응에 중요하게 작용한다. PG는 arachidonic acid가 두 단계를 거쳐 prostaglandin synthase의 작용에 의해 형성된다. 첫번째는 COX에 의

해 arachidonic acid가 cyclic endoperoxide (PGG₂)로 변환되고 이어서 peroxidase에 의해 endoperoxide (PGH₂)가 생성된다. 이렇게 만들어진 unstable intermediate products는 specific isomerase enzymes에 의해 빠르게 여러 prostaglandins (PGE₂, PGF₂, TXA₂ α, PGI₂)으로 변화된다. COX는 constitutive isoform인 COX-1과 inducible isoform인 COX-2의 2가지 형태가 존재하지만 주로 inflammation processes에서는 COX-2가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 염증이 일어난 곳에 proinflammatory PGs가 과량 방출된다. 본 실험에서는 western blot을 통하여 간조직에서의 COX-2의 발현을 측정하였다. 우선 각 군의 간균질액 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 mg을 10% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 tranfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시킨다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-COX-2 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 3시간 동안 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 anti-goat-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing 하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다. PGE₂의 생성은 PGE₂ enzyme-immunoassay kit (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)를 이용하여 지시한 방법따라 측정하였다.

10. 세포배양을 이용한 산화적 세포사멸 보호효과 및 분자생물학적 작용기전 규명

가. 세포독성에 대한 보호효과

NO donor를 PC12 세포에 처리 후 일정시간 간격으로 세포사멸의 형태학적 변화를 phase contrast microscope을 이용하여 관찰하였다. 별도의 실험에서 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 정량적으로 측정하였다. PC12 cell을 poly-D-lysine으로 코팅된 48-well dish에 1×10⁴개/well의 density로 깐 다음 DMEM (Dulbeccos

modified eagle medium) 85%, FBS(fetal bovine serum) 5%, HS (horse serum) 10% 에서 이를 배양하였다. 이후 참치로부터 추출한 핵산복합물질을 N2 defined media (DMEM, F12 nutrient, N2 suppleiement, sodium pyruvate)에 적정 농도로 가한 뒤 NO donor를 처리하였다. 이후 여기에 MTT solution (최종농도 1 mg/ml)을 가하고 2 시간 동안 배양한 뒤 20% sodium dodecylsulfate 와 50% dimethylformamide로 용해 시킨 후 540 nm에서 optical density를 microplate reader로 측정하였다.

나. apoptosis 유도에 대한 억제 효과

과량으로 생성된 NO는 배양된 세포에 있어 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있으며, 한편 NO 생성을 억제함으로써 이러한 세포사멸은 억제되는 것으로 알려져 왔다. apoptosis는 chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blabbing, apoptotic body 형성 등으로 특징 지워질 수 있으며, 그 중 세포 내 효소작용 메커니즘에 의해 DNA가 180-200bp로 잘라져 유도되는 DNA fragmentation은 DNA ladder, TUNEL staining 등으로 측정 가능하다. 본 실험에서는 TUNEL staining (DNA fragmentation *in situ*)을 이용하여 apoptosis를 측정하고자 하였다. PC12 (105 cells/3ml)를 chamber slide에 넣고 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질을 처리하고, NO donor를 가한 뒤 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 덜어낸 후 4% neutral buffered formalin (100ml)을 넣어 1시간 동안 고정시키고 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 H2O2 (0.3% in methanol)로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단한 후, 4℃에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 cells을 permeable하게 하였다. TUNEL reaction mixture (terminal deoxynucleotidyl transferase: TdT, digoxigenin-11-dUTP)를 50ml 가하고 37℃에서 1시간동안 배양하여 label시킨 후, peroxidase-conjugated anti-goat antibody를 50ml 가하고 37℃에서 30분 동안 배양하였다. 이후 3,3'-diamino benzidine (DAB) chromogen solution을 50-100ml 넣고 10분간 incubation한 후 50% glycerol로 mounting 하였다.

다. PARP / Caspase-3 억제 효과 검토

apoptosis는 세포사멸의 전형적인 형태중의 하나이며, 여러 가지 유전자가 이러한 과정에 관여하는 것으로 보고되었다. apoptosis의 대표적인 분자생물학적인 메

커니즘중의 하나로 poly ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage와 caspase-3의 activation 등이 이미 제시되어 왔으며, NO 역시 이러한 과정을 통해 apoptosis를 유발한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 참치로부터 분리한 핵산복합물질을 전처리한 군과 그렇지 않은 군에 각각 NO donor를 처리하고, 이들 protein의 발현을 PC12 배양 세포에서 측정하였다. 시약처리 후 PC12 세포는 RIPA bufer (150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 25mM NaF, 20mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na3VO4, protease inhibitor cocktail)로 0°C에서 20분간 lysis시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량을 BCA reagent로 정량을 한 뒤, 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane (Gelman Sciences)에 tranfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-PARP 또는 caspase-3 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 overnight으로 붙이고, PBST용액으로 5분간 3회 washing 한 후 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1 시간동안 붙인 다음 PBST용액으로 5분간 3회 washing 하였다. 이후 enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 x-ray 필름에 노출시켰다.

여 백

제 3 장 연구 결과

제 1절 핵산물질과 핵산복합물질의 추출방법 및 특성에 관한 연구

1. 참치정소로부터 핵산물질 및 핵산복합물질의 최적 추출방법 연구

가. salt의 첨가농도를 달리한 열수추출법에 의한 핵산복합물질의 추출

salt는 일반적으로 널리 이용되는 NaCl을 이용하였으며, 염을 첨가하지 않은 무염추출(control)과 각 농도별로 5%, 10%, 15%, 20%를 첨가하여 염의 첨가량에 따른 수율, 핵산함량, 염도 등을 측정함으로써 생산성을 검토하였다. 추출방법은 Fig 1에 나타낸 것과 같이 참치정소 1kg을 chopping하고 각 농도별로 salt를 첨가하고 나서 3배 분량의 물을 첨가한 뒤 3시간 동안 교반하면서 가열하였다. 이후 원심분리 (6,000rpm, 10min)를 실시하여 상등액을 얻은 뒤 2배 분량의 95% ethanol을 첨가하고 overnight 방치하여 핵산 및 단백질 성분을 침전시킨 후 70% ethanol로 washing 한 뒤 건조 및 분쇄를 통하여 핵산복합물질을 얻었으며 이를 DW-DNA라 명명하였다.

이렇게 얻은 핵산복합물질의 수율, 핵산함량, 프로타민 함량, salt함량 및 회분 함량을 분석하여 Table 1에 나타내었는데, 수율은 20% 첨가구에서 가장 높게 나타났으나 이는 염분이나 회분과 같은 무기질이 다량 함유되어 있기 때문이며 핵산함량을 분석한 결과 10% salt를 첨가한 실험군에서 가장 높게 나타났고 프로타민 함량도 우수하게 나타났으며 기타 염분 및 회분함량도 낮게 나타나 참치정소로부터 핵산복합물질을 추출하는 데에는 10% 염을 첨가한 열수추출법이 가장 이상적이었다.

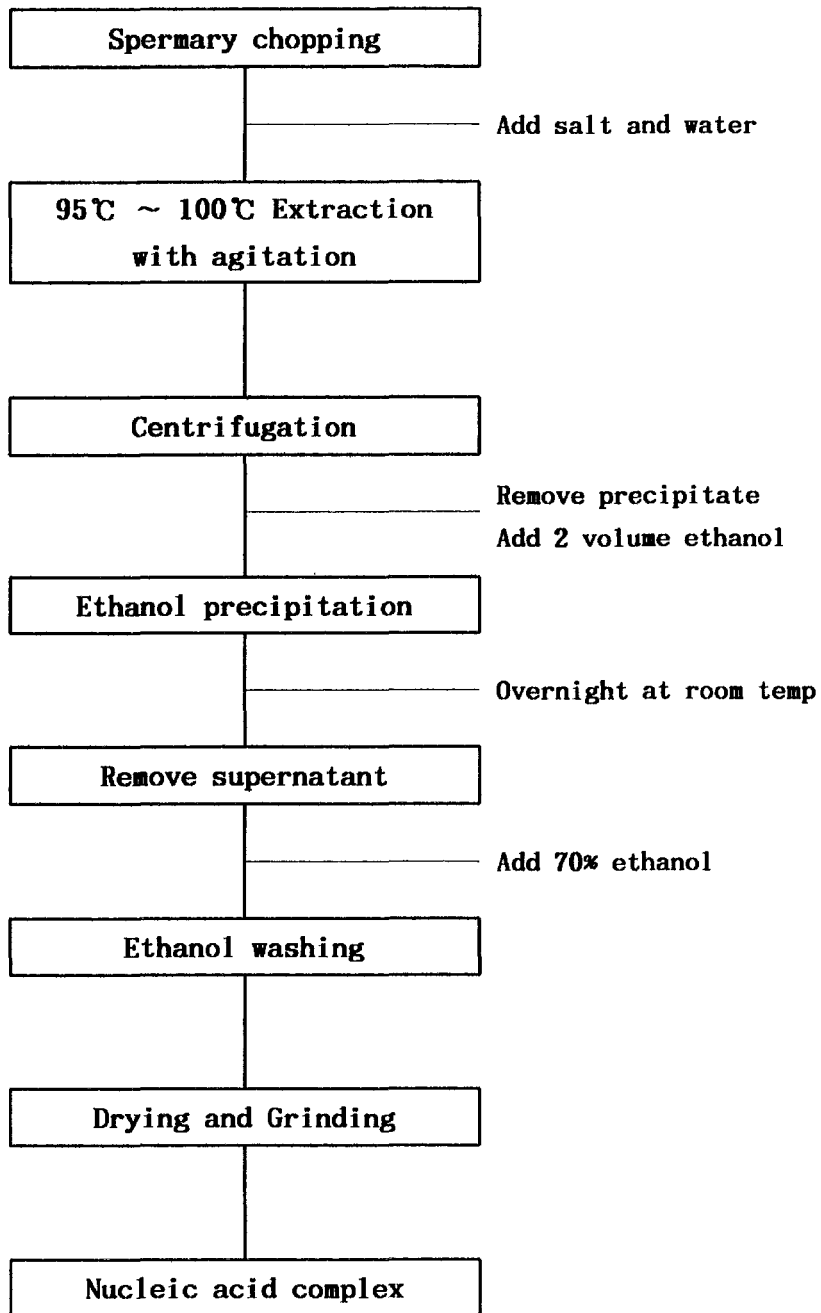


Fig 1. Procedure of heating extraction with salt

Table 1. Yield, nucleic acid, protamine, salt and ash contents according to the salt concentration

sample	Yield (%, dry base)	Nucleic acid (%)	Protamine (%)	Salt (%)	Ash (%)
Control	6.06	23.1	62.3	3.6	17.6
5 %	16.53	59.1	60.0	6.7	24.9
10 %	17.30	74.7	53.4	10.3	28.1
15 %	20.99	32.2	45.5	26.7	38.3
20 %	29.50	20.6	18.8	70.3	74.3

나. 산 가수분해법에 의한 핵산복합물질의 추출

산은 산업적으로 널리 이용되는 HCl을 이용하였고 산의 농도는 각각 0.5N, 1.0N, 1.5N, 2.0N로 하여 가수분해를 실시하였으며 염열수추출법과 마찬가지로 첨가되는 산의 농도에 따른 추출물의 수율, 핵산함량, 프로타민함량, 염분함량 및 회분함량 등을 분석하여 최적의 조건을 설정하였다. 추출방법은 Fig 2에 나타난 것과 같이 참치정소 1kg을 chopping한 후 각 농도의 HCl 용액을 3배 분량 첨가한 뒤 교반하면서 3시간 동안 추출하고 원심분리하여 상등액을 취하고 나서 NaOH로 중화하고 95% ethanol을 이용하여 침전시킨 뒤 70% ethanol로 washing하고 건조 및 분말화하여 핵산복합물질을 추출하였다.

이렇게 얻은 추출물의 각 성분별 함량은 Table 2에 나타내었다. 표에서도 알 수 있듯이 산 가수분해법을 이용하여 추출한 추출물의 프로타민 함량은 10% 염열수추출물과 비슷했으나 수율은 10% 염열수추출물보다 낮았고, 핵산함량은 1% 미만으로 거의 추출되지 않았으며 염분함량이나 회분함량등도 비교적 높게 나타나 산가수분해법에 의해서는 참치정소로부터 핵산복합물질을 추출할 수 없다는 것을 알 수 있었다.

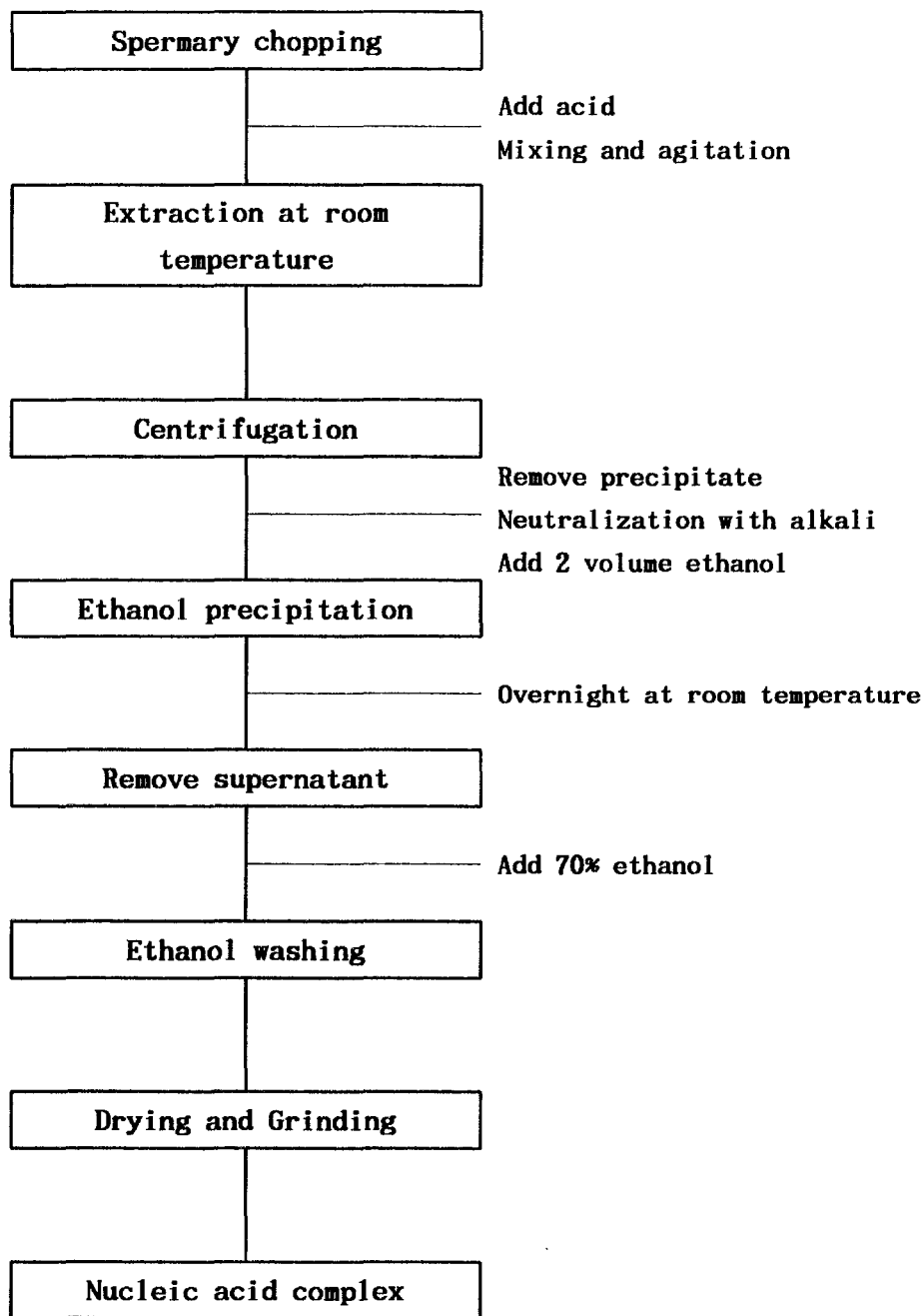


Fig 2. Procedure of extraction with acid

Table 2. Yield, nucleic acid, protamine, salt and ash contents according to the acid concentration

sample	Yield (%, dry base)	Nucleic acid (%)	Protamine (%)	Salt (%)	Ash (%)
Control	6.06	23.1	62.3	3.6	17.6
0.5N	15.97	0.97	62.2	12.0	10.9
1.0N	9.69	0.49	56.5	15.2	18.7
1.5N	12.23	0.34	47.8	31.9	36.7
2.0N	9.02	0.56	44.7	32.9	38.0

다. Alkali lysis에 의한 핵산복합물질의 추출

추출에 이용하는 알칼리 물질로는 분자생물학 등에서 널리 이용되는 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 이용하였고, 농도는 저농도로 0.5% SDS와 고농도 5.0% SDS의 두 농도를 선택하였으며, 산 가수분해법과 같은 방법으로 실험을 진행하였는데 HCl 대신 SDS를 사용하여 알칼리로 분해하고 다음 중화한 절차만 달리하여 실험을 진행하였다.

이렇게 얻은 추출물에 대한 성분분석은 Table 3에 나타내었다. 수율은 첨가되는 SDS의 농도에 관계없이 거의 일정하게 나왔고, 프로타민 함량, 염분함량 및 회분함량 등도 양호하게 나왔으나 핵산함량이 3% 미만으로 0.5N HCl 추출물보다는 2배 이상 높게 나타났지만, 10% 염열수추출물과 비교해서 70% 이상 매우 낮게 나와 참치 정소로부터 핵산복합물질을 추출하는 데에는 Alkali lysis법이 적당하지 않음을 알 수 있었다.

Table 3. Yield, nucleic acid, protamine, salt and ash contents according to the SDS concentration

sample	Yield (%, dry base)	Nucleic acid (%)	Protamine (%)	Salt (%)	Ash (%)
Control	6.06	23.1	62.3	3.6	17.6
0.5N	32.60	1.98	66.0	1.7	12.1
5.0N	30.31	2.62	54.4	5.4	11.8

라. UF(Ultra Filtration)를 이용한 핵산복합물질의 추출

참치정소로부터 NaCl을 이용하여 추출하는 10% 염열수추출 방법이 전 3가지의 추출방법 중에서 최적의 방법으로 선정되었지만 ethanol을 이용함으로써 ethanol 사용을 위한 설비보완이나 ethanol 가격등으로 인해 추출물의 생산성이 떨어지는 단점이 있어 이에 대한 대체 방법으로 UF를 이용한 추출방법을 연구하였다. 먼저 냉동 보관된 참치정소를 해동하고 chopping한 후 3배 분량의 10% NaCl 용액을 첨가하고 나서 3시간동안 교반하면서 가열한 후 원심분리하여 상등액을 취해 핵산복합물질을 추출하였다. 이렇게 추출된 핵산복합물질의 수용액은 점성이 크고 상온에서 겔을 형성하여 한외여과를 실시할 경우 한외여과장치의 배관이나 한외여과막을 막히게 하는 주요인이 되어 더 이상의 공정을 진행할 수 없게 하였다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해 원심분리하여 얻은 핵산복합물질 수용액에 NaOH를 이용하여 시료를 pH 11 이상으로 적정하고 나서 교반하면서 1시간 가열하여 겔화 성분의 결합을 파괴하고 이후 증화하였다. 위와 같이 증화된 시료를 한외여과막이 부착된 한외여과장치에 통과시켜 핵산복합물질을 분리 및 농축하였는데 막의 크기를 10,000 / 30,000 / 50,000 / 100,000의 4종으로 구분하여 각각의 추출을 실행하였고 한 번의 공정만으로는 염분 및 기타 저분자의 물질들을 제거할 수 없어 증류수를 이용하여 3회 이상의 recycle을 실시하였으며 농축액을 회수하여 냉동건조를 실시하고 grinding하여 백색의 핵산복합물질을 얻었으며 이렇게 확립된 추출 공정을 Fig 3에 나타내었다.

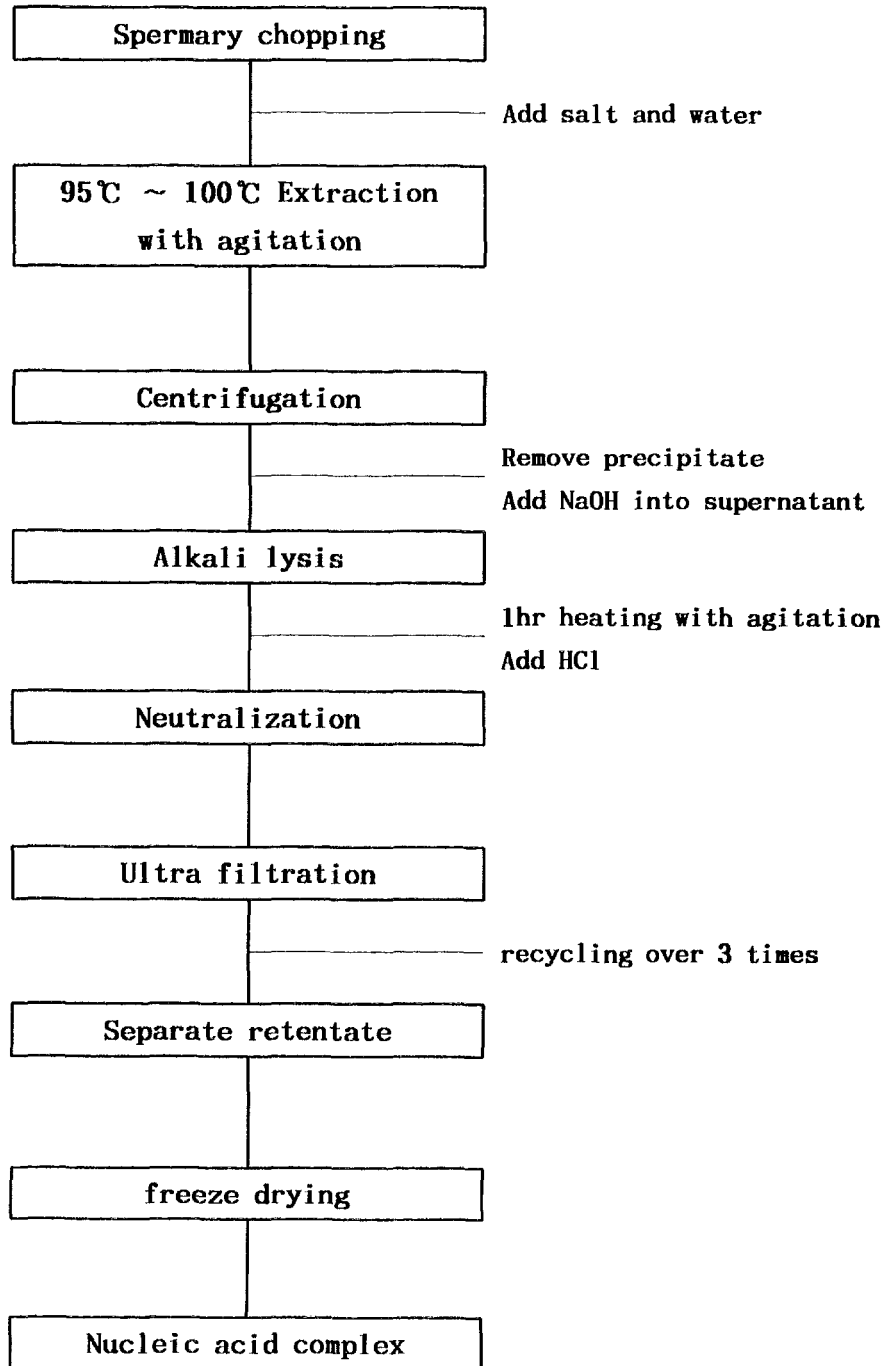


Fig 3. Procedure of extraction using Ultra Filtration

위에서 언급한 것처럼 한외여과막의 크기를 4종으로 구분하여 추출한 추출물에 대한 수율, 핵산함량, 프로타민함량, 염분함량 및 무기질 조성을 분석하였으며 이는 Table 4에 나타내었다. 수율은 10% 염열수추출물과 거의 유사하게 나왔으며 핵산함량은 10% 염열수추출물의 74%보다 대체적으로 모두 높게 나타났고, 염분함량도 양호하게 나와 참치정소로부터 핵산복합물질을 추출하는데 가장 적합한 방법으로 판단되었다.

Table 4. Contents of each component in extracts separated by ultra filtration according to the membrane size

	MWCO 10,000	MWCO 30,000	MWCO 50,000	MWCO 100,000
Yield (%)	19.09	13.90	13.21	1.78
Nucleic acid (%)	82.4	83.6	84.8	79.2
Protamine (%)	52.2	48.4	48.3	40.5
Salt (%)	5.17	5.21	4.83	4.23
Mineral				
Ca (ppm)	194.39	1605.57	278.14	337.10
Mg (ppm)	732.19	823.48	651.95	622.15
Fe (ppm)	53.40	72.54	81.76	80.93
Cu (ppm)	1.56	1.43	1.82	6.21

마. 산 가수분해법의 변형에 의한 핵산물질의 추출

산 가수분해법을 이용하여 참치정소로부터 핵산복합물질을 추출하는 연구에서 최종 추출물의 핵산함량이 1% 미만인 것을 감안하여 추출과정 중 핵산성분을 제거하는 공정이 있음을 파악하고 이 공정을 변형시킴으로써 핵산물질을 추출하는 방법으로 이용하고자 하였다. 핵산물질을 추출하는데 결정적으로 문제가 되었던 것은 산을 첨가하여 가수분해할 경우 핵산성분은 상등액으로 용해되어 나오는 것이 아니

라 산 불용성인 침전물로 된다는 것을 알아내었다. 또한 원가상승의 요인이 되는 ethanol 사용을 억제하고 추출물에 함유된 고농도의 염 성분을 제거하기 위해 산가 수분해법을 변형하여 핵산물질을 추출하는 추출공정을 확립하였으며 이는 Fig 4에 나타내었다.

먼저 냉동 저장중인 참치정소 1kg을 해동한 후 Chopper를 이용하여 균질화하고 나서 3배 분량의 10% NaCl 용액을 첨가한 뒤 3시간동안 교반하면서 가열하였다. 고온의 상태에서 원심분리를 실시하여 상등액을 모은 후 상등액에 HCl 원액을 첨가하여 pH를 1.5 이하로 적정하였다. 이 경우 핵산성분은 침전되어 하층에 가라앉아 응고하게 되고 염을 포함한 기타 성분들은 상등액에 잔존하게 되어 손쉽게 분리가 가능하였다. 그리고 나서 침전물에 잔존하는 염 성분들을 제거하기 위해 동일분량의 증류수로 2회 정도 세척하였으며 응고된 침전물로 있는 핵산성분을 녹이기 위해 1/10 분량의 1N NaOH를 첨가하고 나서 교반하면서 열을 가해 핵산성분을 가용화시켰다. 이렇게 가용화된 추출물에는 소량의 협잡물등이 잔존하므로 이를 제거하기 위해 filter press를 이용한 규조토 여과를 다시 한 번 실시하여 완전히 제거하고 건조한 뒤 분말화하여 핵산물질을 추출하였다.

위와 같은 공정을 통해 얻어진 핵산물질의 수율은 약 2.2% (참치정소 1kg을 이용하여 총 22g의 핵산물질 획득) 이었으며, 핵산함량을 분석한 결과 약 89% 이상으로 나타나 고함량의 핵산물질을 간단한 공정으로 생산할 수 있었다.

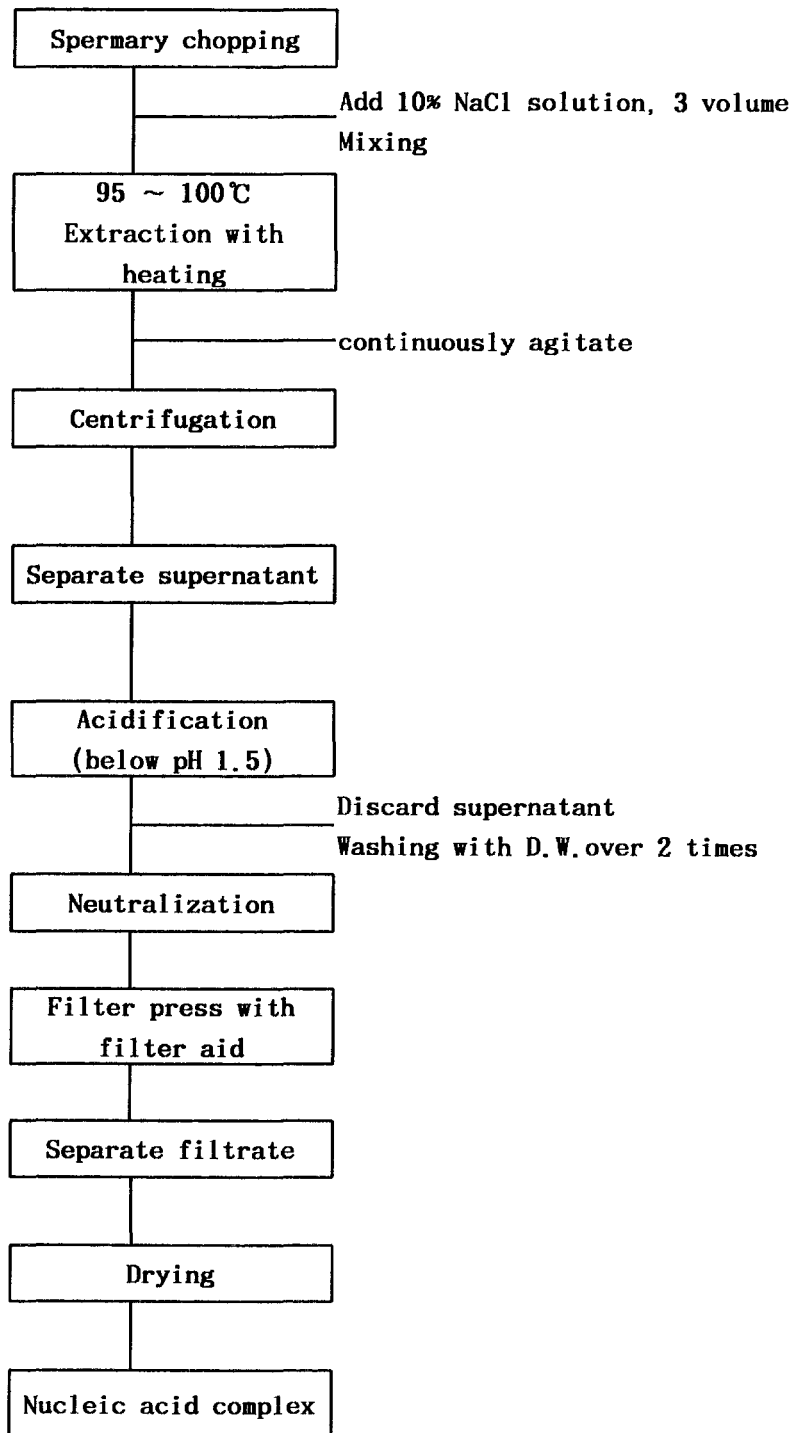


Fig 4. Procedure of extraction by modified acid hydrolysis

2. 각 추출방법별 핵산복합물질의 분자량 분포 분석

핵산복합물질을 추출하는데 적합한 방법으로 선정된 10% 염열수추출물과 현재 일본에서 수입 판매되고 있는 연어백자추출물, DNA-Na (DNA 함량 90% 이상, 연어정소에서 추출)에 대하여 분자량 분포를 비교 분석하였고, UF를 이용한 추출물에 대한 분자량 분포의 경우 추출에 사용된 4가지 (MWCO 10,000 / 30,000 / 50,000 / 100,000) 한외여과막의 크기별로 분석하여 추출물의 막 크기에 따른 변화를 분석하였으며 변형된 산가수분해법을 이용하여 추출한 핵산물질에 대한 분자량을 분석하였는바, 분석은 제 2장 연구방법에서 나타낸 것과 같은 방법으로 실시하였고 표준 곡선과 비교하여 확인하였다.

Fig 5에 나타난 것과 같이 10% 염열수추출물의 경우 약 135kDa 정도의 큰 분자량을 나타내었고 이는 일본 DNA-Na이 나타내는 94kDa과 유사하였으며 하나의 큰 main peak를 나타내었다. 반면 일본 연어백자추출물은 1.33kDa과 13.4kDa의 두 개의 peak를 나타내었는데 다른 두 추출물보다 매우 작은 분자량을 나타낸 것이 특징이었다. 한편 한외여과막 크기별로 추출한 핵산복합물질의 분자량을 분석한 결과 MWCO 10,000의 크기를 갖는 membrane을 이용한 경우 100kDa보자 조금 작은 98kDa을 나타내었고 MWCO 30,000의 경우는 109kDa, MWCO 50,000은 108kD, 마지막으로 MWCO 100,000인 경우에는 약 139kDa을 나타내어 4종 모두 100kDa 내외의 분자량을 나타내었으며 단일 peak로 나타나 membrane 크기에 따른 분자량의 차이는 크게 나타나지 않음을 알 수 있었고 또한 단일 peak로 나타난 것으로 보아 단백질과 핵산이 분리되어 존재하기 보다는 결합하여 분자량이 큰 핵단백 형태의 물질로 존재한다고 추정되어졌다 (Fig 6).

마지막으로 변형된 산가수분해법에 의해 추출한 핵산물질의 경우 Fig 7에 나타난 것과 같이 1.52kDa, 7.2kDa 두 개의 peak로 나누어졌으며 이는 일본에서 수입 판매중인 연어백자추출물과 매우 유사한 경향을 보였다. 따라서 일본에서 제조하는 연어백자추출물은 산에 의한 분해를 실시하여 추출하는 것임을 간접적으로 확인할 수 있었다.

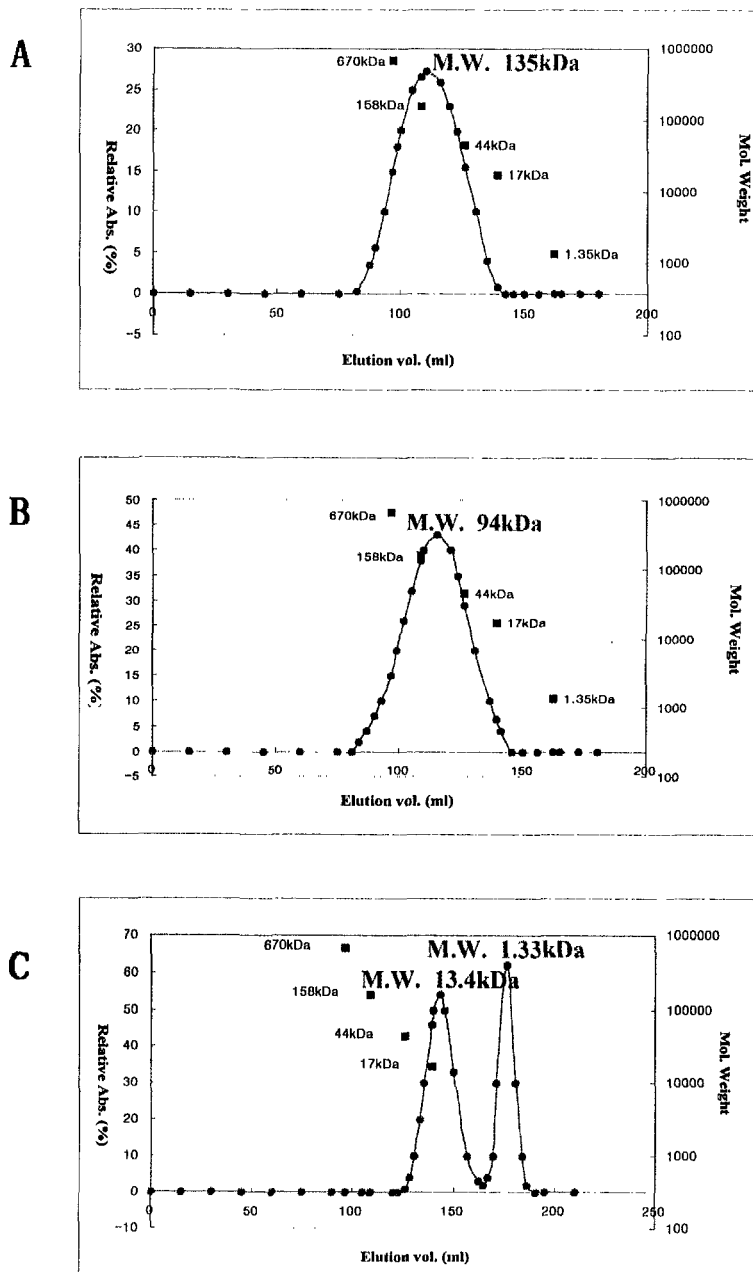


Fig 5. Gel chromatogram of each nucleic acid complex

A : Extract by heating with 10% salt from tuna spermary

B : DNA-Na from salmon spermary in Japan

C : Extract from salmon spermary in Japan

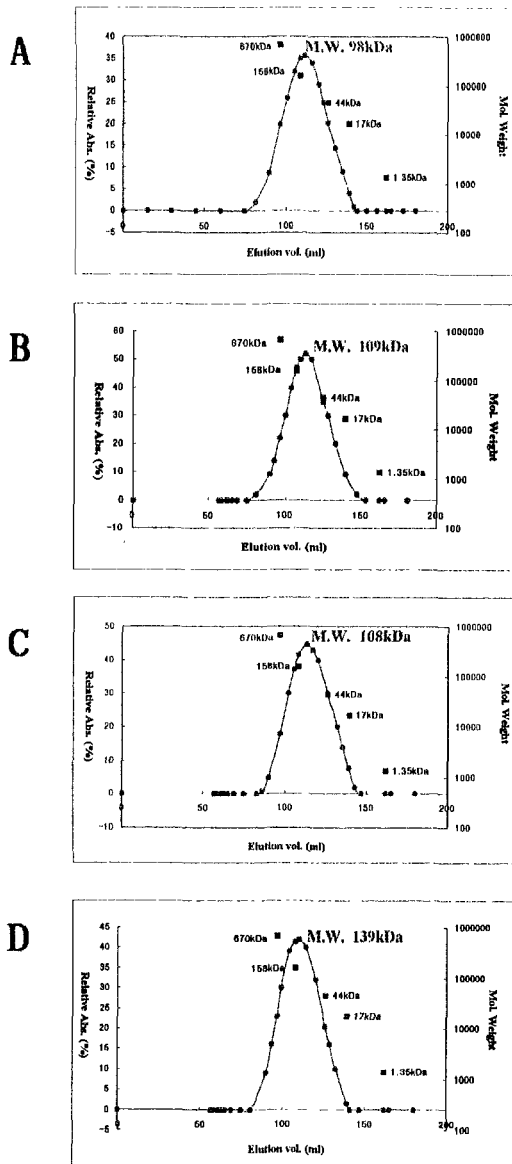


Fig 6. Gel chromatogram of extracts separated by UF according to the membrane size

- A : membrane size MWCO 10,000**
- B : membrane size MWCO 30,000**
- C : membrane size MWCO 50,000**
- D : membrane size MWCO 100,000**

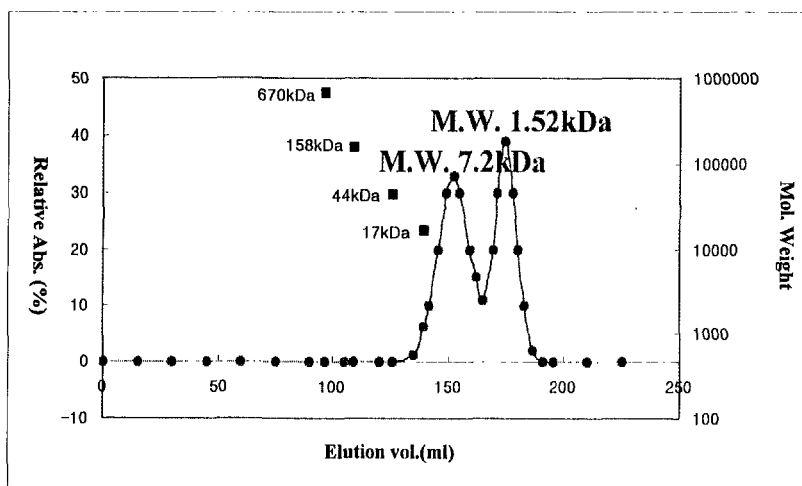


Fig 7. Gel chromatogram of nucleic acid separated by modified acid hydrolysis

3. 핵산복합물질의 대량생산을 위한 Scale-up연구

가. 보유 공장설비를 이용한 핵산복합물질의 추출

참치캔을 생산하는 (주)동원 F&B 창원공장에 설치되어 있는 설비를 이용하여 새로운 설비를 추가하지 않고 기존의 설비만을 이용하여 참치 정소로부터 핵산복합물질을 추출하였다. 창원공장에는 온도조절과 교반 및 산·알칼리 처리가 가능한 반응탱크와 고온에서 분리할 수 있는 원심분리기가 존재하므로 이를 최대한 활용할 수 있는 염열추출법을 이용하였다.

냉동 저장중인 참치정소 35kg을 해동한 후 Silent cutter를 이용하여 균질화하고 나서 3배 분량의 10% NaCl 용액을 첨가한 뒤 3시간 동안 교반하면서 가열하였다. 고온의 상태에서 원심분리를 실시하여 상등액을 모은 후 상등액의 1.5배에 해당하는 95% 에탄올을 첨가하고 overnight 방치하여 핵산복합물질을 침전시킨 뒤 상층에 존재하는 상등액은 사이펀을 이용하여 제거하고 침전된 핵산복합물질을 잘 수거하여 건조시킨 후 분쇄하고 100mesh의 체를 통과시켜 시료를 얻었다.

이렇게 얻은 시료의 성분을 분석하여 Table 5에 나타내었는데, 참치정소 원물 대비 수율은 약 2.8%정도이고 DNA 함량은 56.5%, 회분은 28.0% 등이었고 프로타민 함량은 53.36%로 나타났는데 이는 프로타민 분석에 이용되는 킬달법의 경우 단백질과 핵산의 base 성분이 합산되어 나타나기 때문이며, 식품첨가물 공전상의 이리단백 규정은 50% 이상이므로 이에 충족된다 할 수 있다.

위와 같은 결과를 바탕으로 참치정소로부터 핵산복합물질을 대량생산하는데 있어 기존 동원 F&B에서 보유하고 있는 자체시설만으로도 가능하지만 이 경우 다량의 에탄올을 사용해야 하고 사용 에탄올의 가격이 높아 원가상승의 부담뿐만 아니라 사용 에탄올을 재활용하기 위해서는 에탄올 회수장치등의 설비보완이 이루어져야 가능할 것이라고 판단되었다.

Table 5. Contents and yield of nucleic acid complex(DW-DNA) separated by using previous equipment in Dong won F&B Co.ltd.

Yield	DNA	Protamine	Salt	Ash
2.8	56.5	53.36	10.3	28.0

나. UF 임차를 통한 Scale-up

(주)동원 F&B에는 한외여과장치(Ultra Filtration system)가 설치되어 있지 않으므로 임차하여 Scale up 실험을 실시하였다. 먼저 냉동저장중인 참치정소 70kg을 해동하고 silent cutter를 이용하여 고르게 균질화한 후 3배 분량의 10% NaCl 용액을 첨가하여 교반하면서 3시간 동안 가열하였다. 이렇게 가열 추출된 용액을 고온에서 15,000rpm의 속도로 원심분리하여 불필요한 협잡물등을 제거하여야 하지만 이러한 적성이 맞는 원심분리기는 기존에 없으므로 filter press를 이용한 여과를 실시하였다. 여과조제로는 규조토등을 이용하였으며 이렇게 여과할 경우 원심분리와 같은 효율의 여과액을 얻을 수 있었다.

이 여과액은 상온에서는 점질성이 강한 액상으로 존재하여 이후의 공정을 진행할 수 없으므로 점도를 낮추기 위해 NaOH를 첨가하여 pH를 12로 보정한 후 1시간동안 교반하면서 가열하였다. 이후 상온으로 방냉 후 중화하고 나서 한외여과장치를 통과시켰다. 핵산복합물질 성분을 분리 및 농축하기 위해 MWCO 20,000의 size를 갖는 한외여과막을 이용하였으며 염분 및 기타 저분자의 불필요한 물질을 제거하기 위해 증류수를 이용하여 3번 recycling을 실시하였고 이후 건조 및 분말화공정을 진행하여 시료를 얻었다.

이렇게 얻은 시료의 핵산 및 기타 성분들의 성분을 분석한 결과를 Table 6에 나타내었는데, 이 추출물의 경우 약 2% 정도의 수율 (1.4kg / 참치정소 70kg)을 나타내었고, 핵산함량을 분석해본 결과 약 82% 정도로 나타났으며 이는 상당한 정도의 핵산함량이었다. 임차한 UF system의 경우도 공장의 생산 line과 연결시켜 이용하는데 문제가 없었으므로 참치정소로부터 핵산복합물질을 대량생산하기 위해 협잡물

을 제거할 수 있는 규조토 여과장치와 필요로 하는 핵산복합물질을 분리 농축할 수 있는 UF system만 갖추어진다면 충분히 대량생산이 가능하다고 판단되었다.

Table 6. Contents and yield of nucleic acid complex separated by using ultra filtration system at Dong won F&B Co. ltd.

Yield	DNA	Protamine	Salt	Ash
2.0	82.4	51.23	10.32	16.0

제 2절 핵산복합물질의 면역활성 연구

1. 체액성 및 세포성 면역에 미치는 영향

가. 마우스의 복강내 세포에 대한 작용

다형핵 백혈구가 암세포에 대한 세포 독성 및 암세포의 퇴행에 효과세포로 작용하며, 대식세포와 더불어 숙주 방어의 초기 단계에 비특이적 면역 반응의 주요 역할을 하므로 이에 대한 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질(이하 DW-DNA)의 영향을 살펴보았다.

ICR 마우스에 DW-DNA 50mg/kg/day를 경구투여하고 복강 세포수를 날짜별로 관찰한 결과투여 후 1일째 대조군의 4.2×10^6 세포에 비해 약 7.9×10^6 세포로 현저하게 증가하여 2 ~ 3일간 지속되었으며, 4일 이후부터는 차차 감소하여 제 7일에는 거의 대조군과 비슷한 수준이었다(Fig 8).

복강세포를 Giemsa 시약으로 염색하여 differential white cell count를 실시한 결과 Fig 9와 같은 양상을 보였다. 시료를 투여하기 전 대조군의 복강세포는 대부분이 lymphocyte였으나 시료투여 후 제 1일 및 제 2일에 증가된 복강세포 중 다형핵 백혈구 및 단구의 비율이 상대적으로 증가되었다. 이렇게 증가된 다형핵 백혈구는 암세포에 대한 세포 독성 및 암세포의 퇴행에 효과세포로 작용하며, 대식세포와 더불어 숙주 방어의 초기 단계에 비특이적 면역 반응에 큰 도움을 줄 것으로 사료되었다. 이후 제 4일째에는 다형핵 백혈구의 경우 거의 관찰되지 않을 정도로 그 비율이 감소되었고 단구도 완만하게 감소하였다.

나. 마우스의 비장내 면역세포에 대한 작용

면역세포들이 활성화되면 여러 가지 세포 분비물의 증가나 다른 세포에 자극을 줄 수 있는 factors를 분비하거나 기능 항진 및 세포 표면항원이 특징적으로 변하게 된다. 암의 진전에 따른 마우스의 비장내 면역세포들에 대한 DW-DNA의 영향을 검토하기 위한 방법으로, 세포 표면항원의 증가 여부 및 정도를 이들 항원에 대한 단일 클론 항체에 형광물질을 부착시키고 세포와 반응시킨 후 세포에 부착된 형광 강도를 flow cytometer를 사용하여 특정하였다.

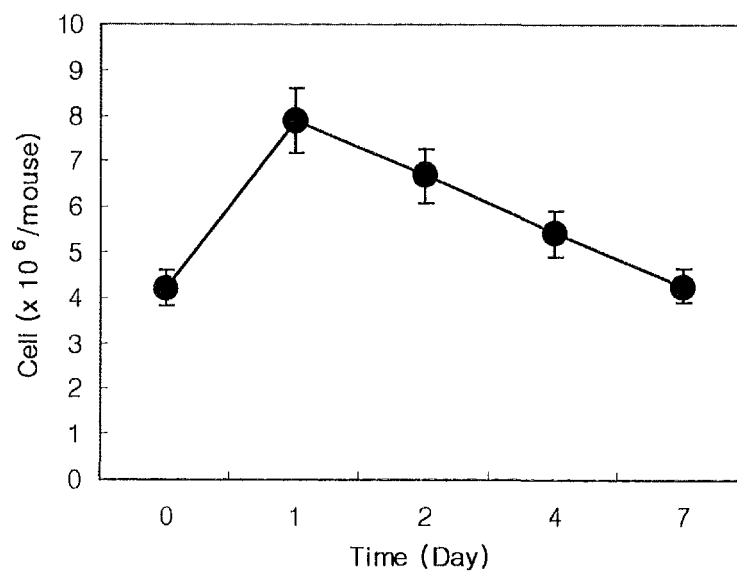


Fig. 8. Effects of DW-DNA on the peritoneal exudate cells in male ICR mice.

Sample was administered once orally into the mouse at a concentration of 50 mg/kg. The the total peritoneal exudated cells were counted by haemocytometer after 1, 2, 4 and 7 days.

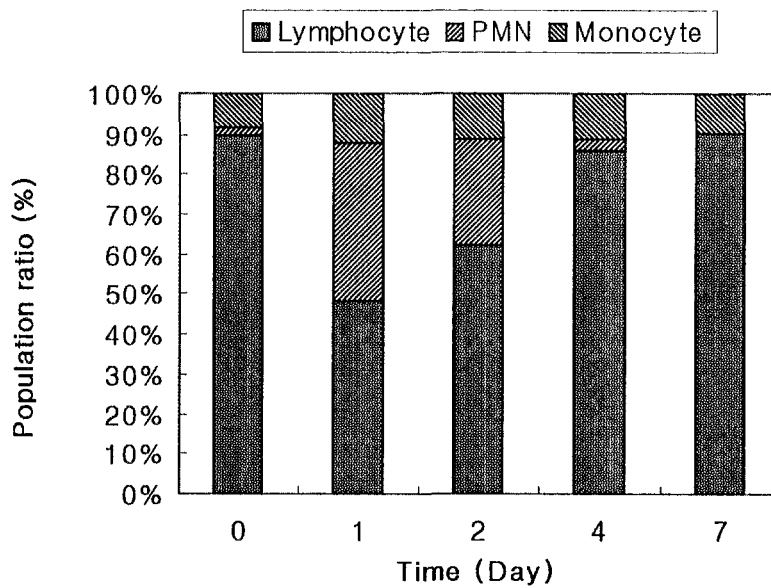


Fig 9. Differential counts of peritoneal exudate cells in male ICR mice.

Sample was administered once orally into the mouse at a concentration of 50 mg/kg. Differential leukocytes were counted by Giemsa staining of the peritoneal exudated cells after 1, 2, 4 and 7 days.

암세포 이식 후 제 7일째 마우스 비장내 면역세포의 표면항원 변화에 미치는 DW-DNA의 대식세포의 경우, 표면항원인 Mac-1⁺ cell의 비율이 암세포를 이식한 T군의 28%에 비해 암세포를 이식하고 DW-DNA를 투여한 TS군이 약 50%로 그 증가 현상이 현저하였다. B lymphocyte의 표면항원인 CD19⁺ 및 helper T cell의 표면항원인 CD4⁺ cell의 비율은 T군에 비해 증가된 양상이었으며, cytotoxic T cell의 표면항원인 CD8⁺ cell의 비율은 N군, NS군, T군 및 TS군 상호간에 변화가 없었다. 제 14일째에는 실험 초기에 비해 TS군에서 Mac-1⁺ cell의 증가폭이 둔화되어 약 30% 정도였고, CD8⁺ cell이 T군보다 약간 증가된 양상을 나타내었다. 제 21일째에도 전반적으로 TS군에서 CD4⁺, CD8⁺, Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell이 T군에 비해 증가된 양상이었다. 제 28일째 TS군에서 Mac-1⁺ 및 CD19⁺ cell은 그 증가폭이 상당히 둔화되었으며, CD4⁺ 및 CD8⁺ cell은 T군보다 증가하여 그 수준이 N군과 유사하였다 (Fig 10).

다. 마우스의 대식세포 활성화에 대한 작용

대식세포는 외부자극 등에 의해 활성화되면 비특이적 탐식작용 및 임파구의 면역 작용 등의 기능 향진이나 세포의 크기와 여러 가지 세포 분비물이 증가하게 된다. 또한 암세포와 접촉하게 되면 H₂O₂나 OH기 등을 분비함으로써 암세포를 제거하는 기능을 수행한다. 따라서 이러한 작용에 대한 DW-DNA의 영향을 알아보았다. 활성화된 대식세포로부터 분비되는 물질로서 acid phosphatase 및 superoxide anion 양을 측정하여 대식세포의 활성화에 대한 DW-DNA의 영향을 검토한 결과, N군에 비하여 NS군의 경우 acid phosphatase 분비는 1.35배, superoxide anion 분비는 1.27배 증가하였으며 TS군의 경우 T군에 비해 1.64배의 acid phosphatase 및 1.28배의 superoxide anion 증가가 확인되었다 (Table 7, 8).

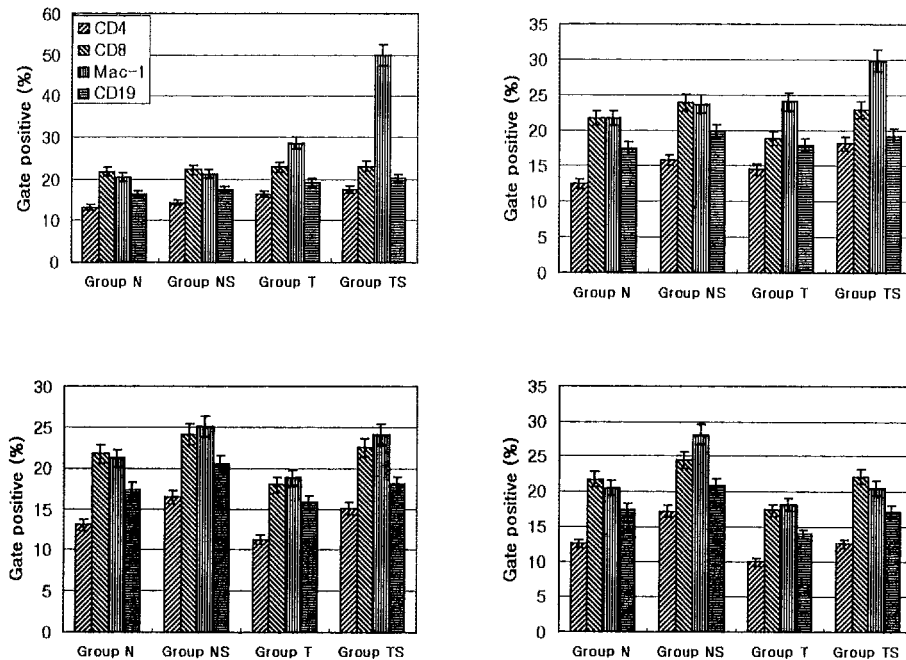


Fig 10. Effects of DW-DNA on the surface antigens of immune cells in the spleen of ICR mice on (A) day-7, (B) day-14, (C) day-21 and (D) day-28 after tumor inoculation.

Sarcoma 180 (5×10^5 cell/mouse) was inoculated in the mouse of T and TS groups on day 0. After 24 hrs, sample was administered orally into the mice of NS and TS groups at the concentration of 50mg/kg/day for 10 consecutive days. Spleen cells were obtained on the 7th of the tumor injection and analyzed with flow cytometer after staining with anti-CD4-FITC (CD4⁺ T cell), anti-CD8-FITC (CD8⁺ T cell), anti-Mac-1-FITC (macrophage) and anti-CD19-FITC (B cell).

Table 7. Effects of DW-DNA on the release of acid phosphatase in normal and tumor bearing ICR mice peritoneal macrophages.

Mice	Group	Stimulation	Acid phosphatase ¹⁾ (μmol)	Stimulation Index ²⁾
Normal	N	Saline	0.83 \pm 0.07 ³⁾	1.00
	NS	DW-DNA ⁴⁾	1.12 \pm 0.01	1.35*
Tumor bearing	T	Saline	0.72 \pm 0.06	1.00
	RS	DW-DNA ⁴⁾	1.18 \pm 0.02	1.64*

* $p < 0.05$

1) p -nitrophenol $\mu\text{mol}/10^6$ macrophage/60 min = $1.15 \times \text{O.D.}$ at 405nm

2) Stimulation index = (Enzyme activity of treated group)/(Enzyme activity of control group)

3) Mean \pm SE

4) DW-DNA was administered orally 50 mg/kg/day for 5 days.

Table 8. Effects of DW-DNA on the release of superoxide anion (SOA) in normal and tumor bearing ICR mice peritoneal macrophage.

Mice	Group	Stimulation	SOA released ¹⁾ (O^{2-} nmol)	Stimulation Index ²⁾
Normal	N	Saline	12.75 \pm 0.46 ³⁾	1.00
	NS	DW-DNA ⁴⁾	16.14 \pm 0.53	1.27*
Tumor bearing	T	Saline	14.50 \pm 0.48	1.00
	RS	DW-DNA ⁴⁾	18.63 \pm 0.73	1.28*

* $p < 0.05$

1) SOA released (O^{2-} nmol/ 10^6 macrophage/90 min) = $15.87 \times \text{O.D.}$ at 550nm

2) Stimulation index = (SOA amount of treated group)/(SOA amount of control group)

3) Mean \pm SE

4) DW-DNA was administered orally 50 mg/kg/day for 5 days.

2. 세포부활 능력에 대한 연구

가. B 임파구 활성화

BALB/c 마우스를 경추 탈구법에 의하여 치사시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄하였다. 얻은 세포 부유액을 원심분리하고 RBC를 제거하기 위하여 pellet을 RBC lysis buffer에 넣고 37°C에서 5분동안 반응한 후 washing 하여 주었다. B lymphocyte만을 얻기 위해 complement mediated cytotoxicity (CMC) 방법을 이용하였다. 단핵구의 splenocyte suspension을 얻은 후 미리 준비해 둔 hybridoma culture supernatant를 넣고 4도에서 1시간 동안 반응하였다. 사용된 hybridoma들은 J1j.10 (anti-Thy1.2 mAb), F4/80 (anti-Macrophage), GK1.5 (anti-CD4), 3.168 (anti-CD8), PK136 (anti-NK cell), 33D1 (anti-Dendritic cell)이고 이들을 culture하고 적당한 시기에 supernatant를 얻어 4도에서 보관하였다가 사용하였다. 한시간 후 cell을 1,500rpm에서 5분간 원심분리하여 harvest하고, 여기에 rabbit complement 1 bottle(Cedarlane)을 10ml의 cytotoxicity medium에 넣어 녹인 후 0.45 μ m filter로 여과하여 cell pellet에 넣어 suspension 상태로 만들었다. 이렇게 처리된 cell을 37°C에서 30분간 반응하여 T cell, Macrophage, Natural killer cell, Dendritic cell을 제거하였다. Flow cytometer를 이용하여 분석한 결과 T cell은 완전히 depletion되었고 대부분의 cell이 B lymphocyte임을 확인할 수 있었다. Hemocytometer를 이용하여 cell을 카운팅한 후 1 X 10⁶/well이 되도록 희석하여 96well round bottom plate에 culture 하였다. DW-DNA sample을 4,000 μ g/ml부터 2배씩 dilution하여 15 μ g/ml까지 희석하여 48시간, 72시간 배양하며 각각의 well에 [methyl-³H] thymidine sp. act. 2 μ Ci 씩을 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 마지막 6시간동안 배양하였다. Multicell harvester에 glass membrane filter를 끼워 탈이온수를 가해 일정하게 적신 후 배양한 세포 반응액을 filter 위에 가하고 free [methyl-³H] thymidine이 완전히 제거될 때까지 여러 번 세척한 후 각각의 filter를 vial에 넣고 완전히 건조시켰다. Lumagel용액을 2ml씩 가하여 투명하게 녹은 반응액을 β -liquid scintillation counter로 측정하였다.

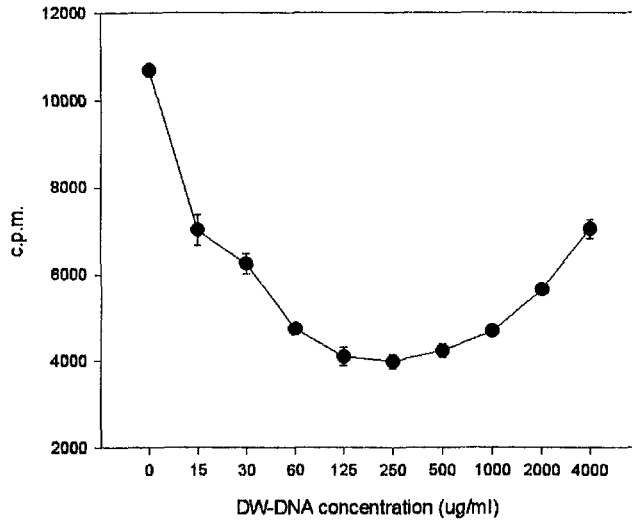
Fig 11에서 나타난 바와 같이 DW-DNA를 넣어주지 않은 well에서 어떤 농도의

DW-DNA를 넣어준 well보다 높은 정도의 proliferation을 보여 DW-DNA가 B cell의 자연적인 proliferation을 저해함을 알 수 있다. 특히 72시간 후의 그래프에서는 이러한 저해효과가 DW-DNA농도에 의존적인 저해임을 관찰할 수 있다.

Fig 11에서 나타난 바와 같이 DW-DNA를 넣어주지 않은 well에서 어떤 농도의 DW-DNA를 넣어준 well보다 높은 정도의 proliferation을 보여 DW-DNA가 B cell의 자연적인 proliferation을 저해함을 알 수 있다. 특히 72시간 후의 그래프에서는 이러한 저해효과가 DW-DNA농도에 의존적인 저해임을 관찰할 수 있다. Total splenocytes의 경우 Figure 12에서 나타난 바와 같이 DW-DNA를 넣어주지 않은 well에서 어떤 농도의 DW-DNA를 넣어준 well보다 높은 정도의 proliferation을 보여 DW-DNA가 total splenocyte의 자연적인 proliferation을 저해함을 알 수 있다. 특히 72시간 후의 그래프에서는 이러한 저해효과가 DW-DNA농도에 의존적인 저해임을 관찰할 수 있다. 흥미롭게도 DW-DNA가 4,000 μ g/ml의 고농도로 존재할 때에 total splenocyte의 자연적인 proliferation이 90%정도까지 억제되는 것이 관찰되었다.

B lymphocyte를 1mg/ml 농도의 DW-DNA에서 배양한 후에 48시간, 72시간 후에 cell을 harvest하였다. cell을 5×10^5 /tube가 되도록 넣고 B cell lineage marker에 대한 항체인 anti-B220-PE과 B cell activation marker인 CD40, CD54, CD80, CD86, MHCII에 대한 biotinylated antibody(Pharmingen)를 넣어 1시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 avidin-FITC(Pierce)를 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 pellet에 paraform aldehyde를 넣어 fixing시킨 후에 Facs tube로 옮겨 PBS로 희석한 후에 Flow cytometer로 분석하였다. Table 9에서 보는 바와 같이 B cell의 activation marker로 알려진 CD40 molecule은 control과 비교하여 24시간 후에 약간의 증가를 보이나 48시간 후에는 control과 차이를 보이지 못하였다. B cell의 다른 activation marker로 알려진 CD86의 경우에도 24시간 후에 약간의 증가를 보이다가 48시간 후에는 control과 차이를 보이지 않았다. 그러나 CD54, CD80, MHC II의 경우에는 24시간, 48시간 후에 control과 비교하여 증가하는 경향을 관찰하지 못하였다. 결론적으로 DW-DNA는 primary culture상에서 normal B cell의 activation에 경미한 정도 혹은 전혀 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

(a) 48 hour



(b) 72 hour

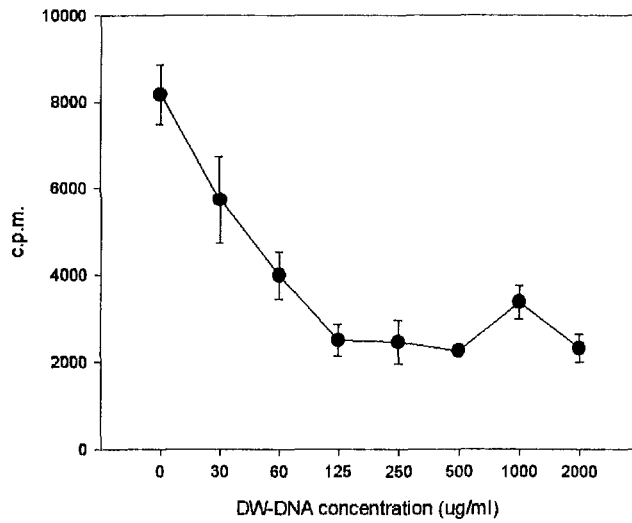
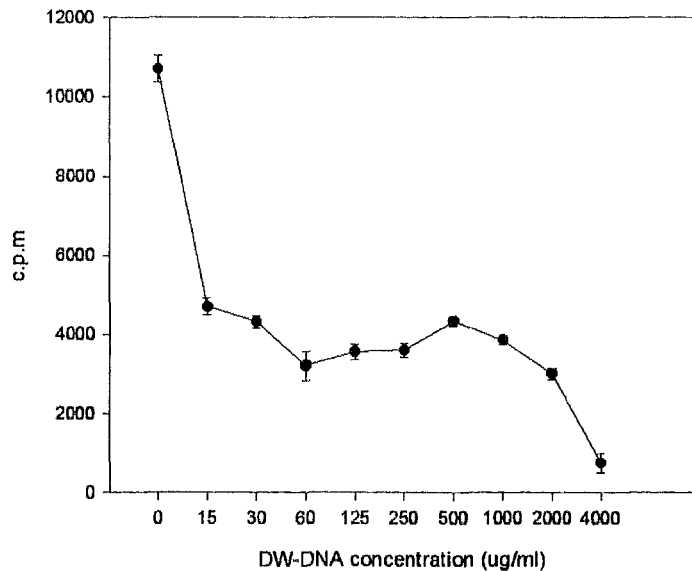


Fig 11. Effect of DW-DNA on the B cell mitogenicity in vitro

(a) 48 hour



(b) 72 hour

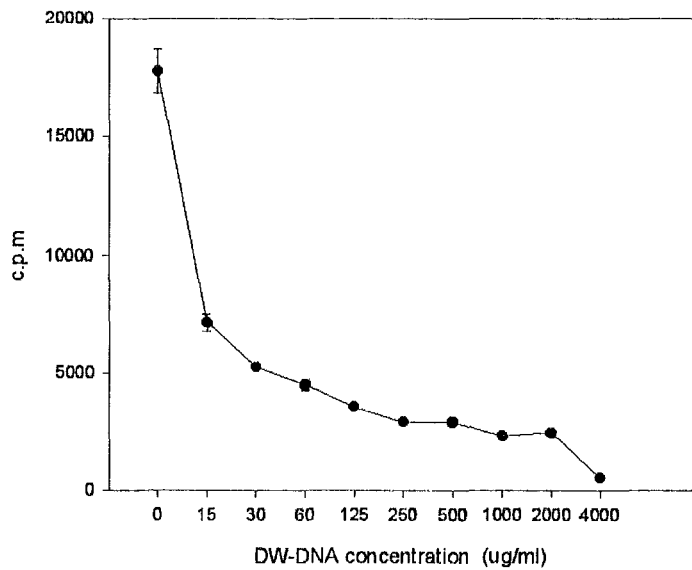


Fig 12. Effect of DW-DNA on total splenocytes mitogenicity in vitro

Table 9. Effect of DW-DNA on the B cell activation in vitro

Activation marker	Molecules expression level			
	24 hour		48 hour	
	DW-DNA	Control	DW-DNA	Control
CD40	78.1	71.5	68.0	72.0
CD54	167.4	168.6	196.6	191.7
CD80	49.1	46.7	53.8	57.7
CD86	59.7	52.6	61.9	60.3
MHCII	135	140.7	139.5	140.5

T cell lineage marker에 대한 항체인 anti-Thy1.2-FITC와 T cell activation marker인 CD28에 대한 biotinylated antibody(Pharmlingen)를 넣어 1시간동안 4℃에서 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 avidin-PE(Bekton Dickinson)를 넣고 4℃에서 30분간 반응하였다. Facs media를 넣고 4,000rpm으로 원심분리하여 washing한 후에 pellet에 paraform aldehyde를 넣어 fixing시킨 후에 Facs tube로 옮겨 PBS로 희석한 후에 Flow cytometer로 분석하였다. Table 10에서 나타난 바와 같이 T cell의 activation marker로 알려진 CD28 molecule은 DW-DNA 1mg/ml의 농도에서 24시간 배양하였을 때 그 발현이 control과 비교하여 경미한 증가를 보였지만 유의성 있는 증가를 보이지는 않았다. 같은 조건으로 48시간 배양했을 때에는 control과 비교하여 어떠한 차이도 관찰할 수 없었다. 결론적으로 DW-DNA는 primary culture상에서 T cell의 activation에 경미한 정도 혹은 전혀 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

Table 10. Effect of DW-DNA on the T cell activation in vitro

Activation marker	Molecule expression level			
	24 hour		48 hour	
	DW-DNA	Control	DW-DNA	Control
CD28	34.3	32.9	33.3	33.4

나. 수축된 림프 소장 접막의 회복에 미치는 영향

DW-DNA의 경구투여, 복강투여가 모델항원인 Ovalbumin(OVA)에 의해 유도된 면역 반응에 미치는 영향을 알아보기로 6주령의 female BALB/c 마우스를 사용하였다. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 하였으며 DW-DNA를 1mg/0.5ml, 1mg/0.25ml의 농도가 되도록 섭취 60℃에서 PBS buffer에 각각 녹였다. 경구투여군의 마우스에는 1mg/0.5ml의 DW-DNA를 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 복강투여군의 마우스에는 1mg/0.25ml의 DW-DNA를 0.25ml씩 이틀간격으로 다섯 번 복강주사 하였다. 대조군에는 0.25ml의 PBS를 같은 방법으로 복강주사 하였다. 마지막으로 투여한지 3일 후에 모델항원인 OVA 20 μ g/마우스의 농도로 complete Freund's adjuvant (CFA)에 유탁하여 복강주사 하였다. 10일 후에 채혈하여 serum을 얻은 후에 ELISA 방법을 이용하여 OVA에 특이적인 IgM, IgG를 측정하였다. OVA 500ng/well을 96well ELISA plate에 coating한 후 1% BSA blocking buffer로 150 μ l/well씩 넣고 실온에서 30분간 blocking 하고, 0.1% BSA dilution buffer로 dilution된 serum을 100 μ l씩 well에 넣고 4℃에서 overnight 반응하였다. 각각의 plate를 Goat-anti-mouse IgM-AP, Goat-anti-mouse IgG-AP를 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응한 뒤 alkaline phosphatase 효소의 substrate인 pNPP를 넣어 발색을 확인하고 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Figure 13에서 볼 수 있듯이 IgM의 생성은 대조군에 비해 DW-DNA를 복강투여한 군에서 유의성있게 증가하는 것이 관찰되었고 DW-DNA를 경구투여한 군과는 비슷한 정도로 IgM을 생성하는 것이 관찰되었다. 1차 면역반응에서 IgG의 생성은 DW-DNA를

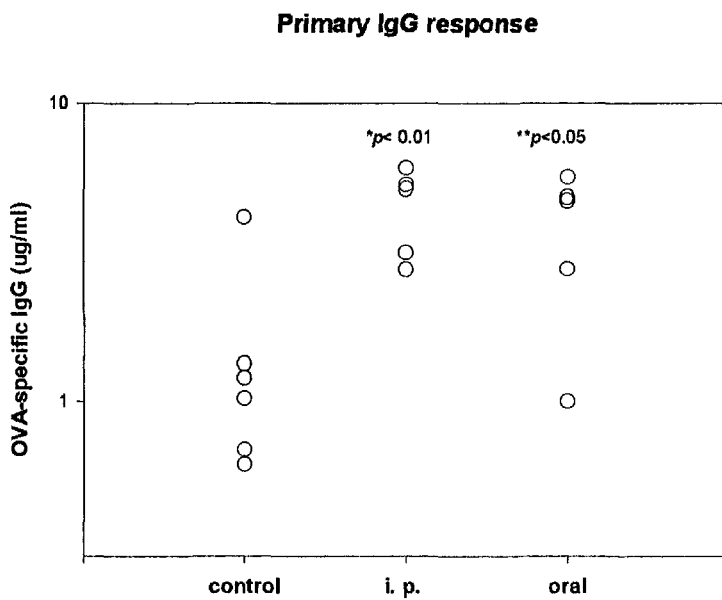
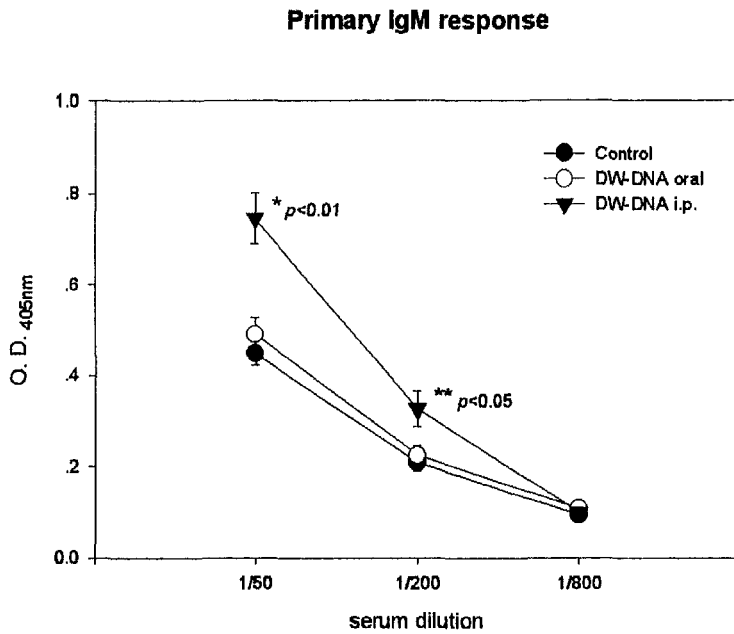


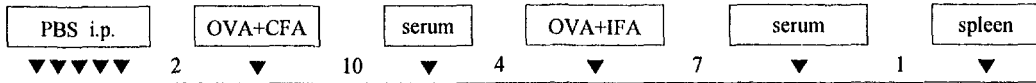
Fig 13. Effects of DW-DNA on the antigen induced primary antibody production

복강투여한 군과 경구투여한 군에서 모두 유의성 있는 증가를 보이는 것이 관찰되었고 그 증가정도는 대조군에 비해 복강투여군에서 2.9배, 경구투여군에서 2.5배였다.

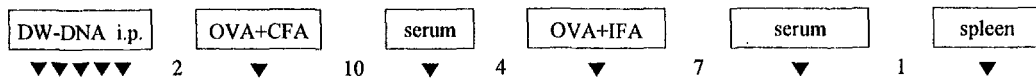
DW-DNA의 섭취가 OVA에 의해 유도된 2차면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Fig 14에서 보는 바와 같이 OVA 20 μ g을 incomplete Freund's adjuvant 에 유탁하여 각 군의 마우스에 복강주사 하였다. 일주일 후에 각 군의 마우스로부터 채혈하여 serum을 얻어 ELISA 분석을 하였다. ELISA는 위에서 기술한 방법과 유사한 방법으로 사용하였고 OVA에 특이한 IgG 항체를 정성, 정량하기 위하여 Goat-anti-mouse IgG-AP를 사용하였다. 2차 면역반응에서 생성된 항원 특이적 total IgG를 정량하여 본 결과 DW-DNA를 투여한 두 실험군에서 대조군보다 높은 농도의 IgG가 생성됨을 확인할 수 있었다. 그 증가 정도는 DW-DNA를 복강 투여한 군에서 2.0배였고, DW-DNA를 경구 투여한 군에서 1.3배였다 (Fig 15).

항원 OVA에 대한 T cell의 반응성을 알아보기 위하여 이들 군의 마우스로부터 spleen을 얻어 T cell proliferation assay를 실시하였다. BALB/c 마우스를 경추 탈구법에 의하여 치사시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망위에서 분쇄하였다. 얻은 세포 부유액을 원심분리하고 RBC를 제거하기 위하여 pellet을 RBC lysis buffer에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 후 washing하여 주었다. 세포수를 5×10^5 cells/well이 되도록 맞추어 96well round bottom plate에 넣고 OVA solution을 최종농도가 500, 100, 20 μ g/ml 혹은 0이 되도록 넣어주고 96시간동안 배양하였다. 배양 중 최후 18시간은 3 H thymidine을 넣어 배양하였고, 세포를 automatic harvester를 이용하여 harvest 하였다. T cell proliferation은 각 well에서 동위원소의 incorporation 정도를 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다. Fig 16에서 볼 수 있듯이 항원 특이적인 T cell의 proliferation은 모든 군에서 in vitro에서 well에 존재하는 항원의 양에 비례하여 proliferation이 증가하는 dose dependent한 경향을 보임을 확인할 수 있었다. 그러나 항원 특이적인 T cell의 proliferation은 DW-DNA를 투여한 군에서 대조군과 비교하여 볼 때 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않는 것을 알 수 있다. 오히려 pulsed OVA의 농도가 500 μ g/ml로 높을 때에는 DW-DNA를 경구로 투여한 군에서 T cell proliferation이 감소하는 것이 관찰되었다. 그러나 pulsed OVA의 농도가 낮을 때에는 위와 같은 경향이 관찰되지 않았다.

(A) Control group



(B) DW-DNA i.p. group



(C) DW-DNA oral group

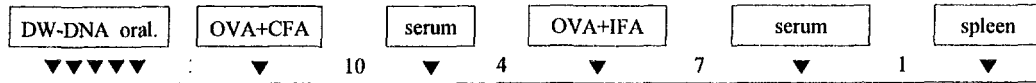


Fig 14. Experimental schedule for DW-DNA

Secondary IgG production : DW-DNA

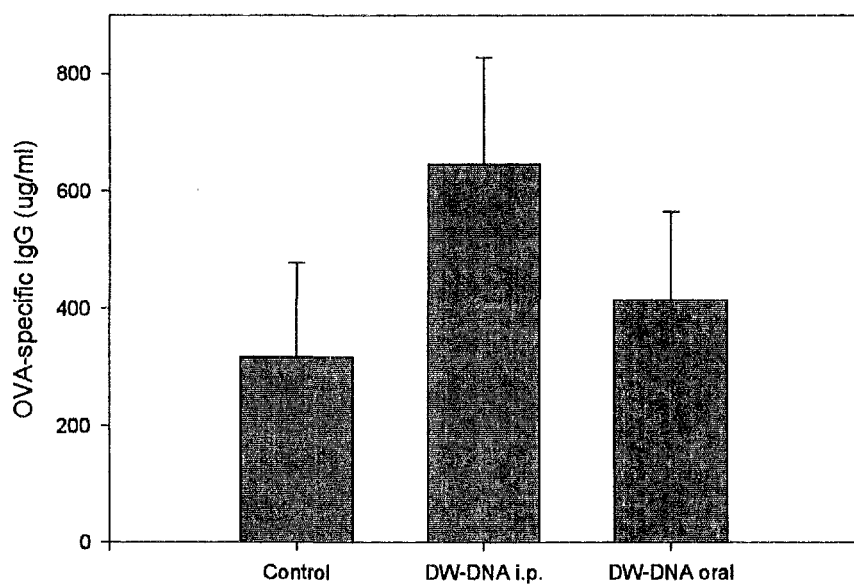


Fig 15. Effects of DW-DNA on the antigen induced secondary IgG production

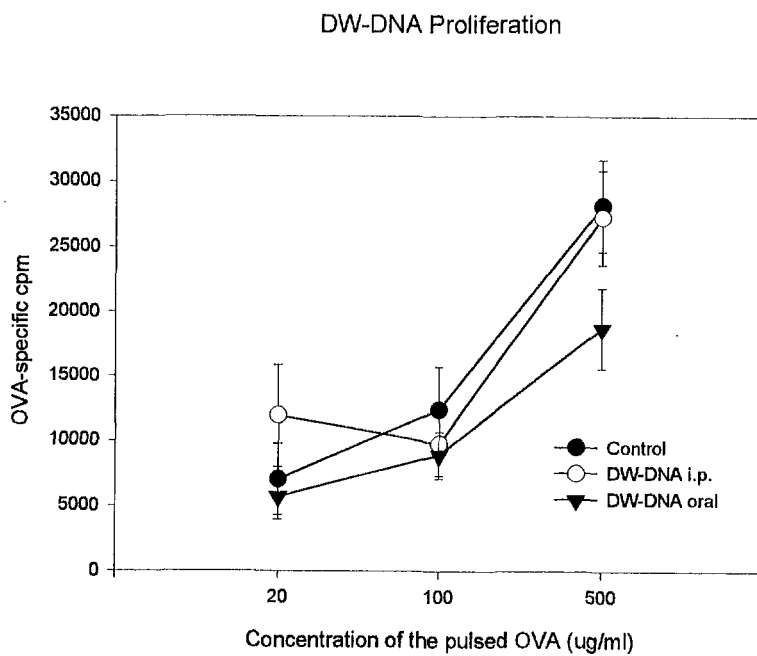


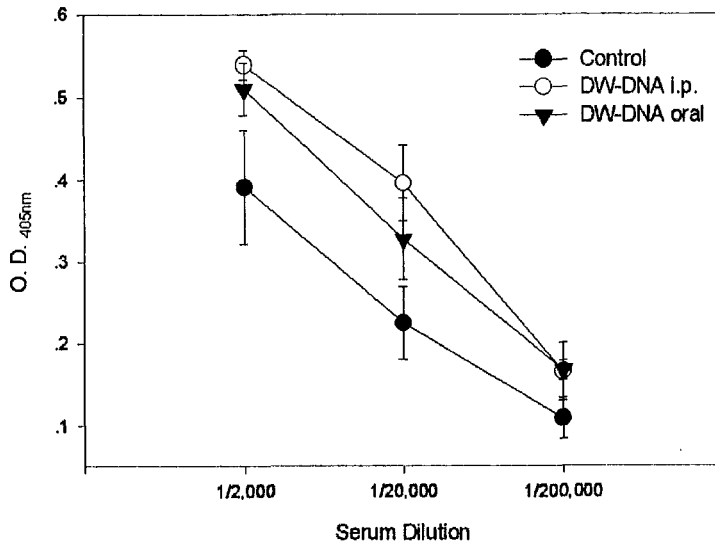
Fig 16. Effects of DW-DNA on the antigen specific T cell proliferation

다. 핵산 섭취가 박테리아 감염에 미치는 영향

박테리아와 같은 microbe의 감염을 제거하기 위해서는 면역반응은 Th1 반응쪽으로 활성화되어야 효율적으로 감염된 microbe를 제거할 수 있다. DW-DNA의 투여가 항원에 의해 유도된 Th1과 Th2 면역반응에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Fig 14와 같이 처리된 마우스의 serum에 있는 항체의 subtype을 ELISA 방법을 이용하여 분석하였다. ELISA는 위에서 기술한 방법과 유사한 방법으로 사용하였고, Th1, Th2 반응의 지표 중 하나로 여겨지는 IgG2a, IgG1 subclass의 IgG를 분석하기 위하여 Goat-anti-mouse IgG2a-AP, Goat-anti-mouse IgG1-AP를 사용하였다. 항원 OVA에 의해 유도되는 Th1 면역반응, 즉 IgG2a의 생성은 대조군과 비교하여볼 때 DW-DNA를 투여한 군에서 현저한 증가를 관찰할 수 있었다(Fig 17). 통계적으로 분석하여 본 결과 IgG2a의 증가는 DW-DNA를 복강 투여하였을 때 유의성 있는 증가($p < 0.05$)를 보였다. 흥미롭게도 DW-DNA를 경구투여 한 군에서 높은 IgG2a의 증가를 관찰하였고 이 증가는 통계적으로 유의성 있는 증가($p < 0.01$)였고 세 군의 경향 중 가장 높은 양의 IgG2a를 생성한다고 결론지을 수 있다. 특히 Fig 15에서 total IgG의 증가는 DW-DNA를 복강으로 투여하였을 때 가장 높은 생성을 보였고 경구투여 시에는 적당한 정도로 증가되었음을 감안하여 본다면 DW-DNA의 경구로의 투여는 항원 특이적인 Th1 반응을 향상하는 데 아주 효율적인 방법임을 시사해 준다. Th2 반응의 지표중 하나인 IgG1의 생성도 DW-DNA를 투여한 모든 군에서 그 생성이 증가하였으며(Fig 17), 특히 DW-DNA를 복강 투여한 군에서 주목할 만한 증가를 보이는 것이 관찰되었고 이는 Fig 15의 total IgG의 생성 결과와 일치하였다.

이러한 Th1 반응의 유도가 용량 의존적인지 또 연어백자추출물의 Th1 반응의 유도 정도와 비교하기 위하여 다음 실험을 진행하였다. 6주령의 female BALB/c 마우스를 사용하였고 4마리의 마우스를 한 군으로 하였다. DW-DNA를 0.1mg/0.5ml, 1mg/0.5ml, 10mg/0.5ml의 농도가 되도록 섭씨 60°C에서 PBS buffer에 각각 녹였다. 연어백자 추출물도 1mg/0.5ml이 되도록 PBS에 녹였다. 각군의 마우스에는 0.5ml의 DW-DNA, 0.5ml의 연어백자추출물 혹은 PBS를 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 마지막으로 투여한지 3일 후에 모델항원인 OVA 20 μ g/마우스의 농도로 complete Freund's adjuvant(CFA)에 유탁하여 복강주사 하였다. 2주 후에 OVA 20 μ g을 incomplete Freund's adjuvant에 유탁하여 각 군의 마우스에 복강주사 하였다.

Comparison of IgG1 production



Comparison of IgG2a production

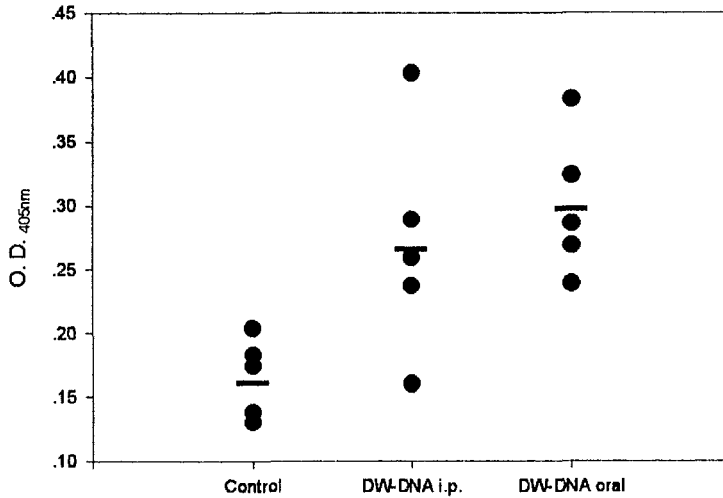


Fig 17. Effects of DW-DNA on the production of IgG1 and IgG2a induced by antigen

일주일 후에 채혈하여 그 안의 항원 특이적인 항체를 분석하였다. ELISA는 위에서 기술한 방법과 유사한 방법으로 사용하였고 OVA에 특이한 IgG 항체를 정성, 정량하기 위하여 Goat-anti-mouse IgG-AP를 사용하였고 IgG2a, IgG1 subclass의 IgG를 분석하기 위하여 Goat-anti-mouse IgG2a-AP, Goat-anti-mouse IgG1-AP를 사용하였다. Fig 18에서 볼 수 있듯이 대조군에 비교하여 보았을 때 DW-DNA를 투여한 군에서 IgG 생성량이 증가하였음을 관찰할 수 있었다. 연어백자추출물을 투여한 군에서도 IgG의 생성은 증가하였으며 그 증가정도는 같은 농도의 DW-DNA와 비슷한 정도였다. 이러한 결과는 Fig 15에서 보여주는 결과와 일치하였다. 또 DW-DNA 투여 군에서는 그 증가정도가 용량 의존적인 양상임을 관찰할 수 있었다.

항원 OVA에 의해 유도되는 Th1 면역반응, 즉 IgG2a의 생성은 대조군과 비교하여 볼 때 ODW-DNA를 투여한 군에서 현저한 증가를 관찰할 수 있었다(Fig 19). DW-DNA를 투여한 군에 있어서 IgG2a의 생성은 DW-DNA를 0.1mg/0.5ml 정도의 저농도로 처리한 군에서도 대조군과 현저한 차이를 보임을 관찰할 수 있었다. 연어백자추출물을 투여한 군에서도 역시 IgG2a의 생성이 증가되어 있음이 확인되었고 그 정도는 DW-DNA를 처리한 군과 비슷한 정도였다(Fig 19). 또 IgG1 생성을 비교하여본 결과, DW-DNA를 투여한 군에 있어서 IgG1의 생성은 DW-DNA를 0.1mg/0.5ml 정도의 저농도로 처리한 군에서도 대조군과 현저한 차이를 보임을 관찰할 수 있었다. 연어백자추출물을 투여한 군에서는 IgG1의 생성은 대조군과 비슷한 정도임이 확인되었다. 종합하여 보면 DW-DNA를 경구투여한 군에서는 0.1-10mg/0.5ml의 범위 안에서는 그 농도에 상관없이 IgG의 생성을 증가시키고, IgG의 subtype중 IgG1, IgG2a의 생성을 모두 증가시킨다. 연어백자추출물의 경구투여는 IgG의 생성을 증가시키고 그중 특히 IgG2a를 증가시키는 것으로 관찰되었다. 또 연어백자추출물과 DW-DNA는 IgG2a의 생성을 증가시키는데 비슷한 정도로 영향을 미치는 것으로 판단된다.

지금까지 결과를 분석해 보면 DW-DNA의 투여는 면역반응을 전반적으로 활성화시키고 특히 박테리아 감염시 그 제거를 담당하는 Th1 반응 역시 우수하게 증강시키는 것으로 판단된다. DW-DNA가 Th1반응을 유도한다는 좀더 구체적인 증거를 제시하기 위하여 Th1 반응에서 대표적으로 생성되는 IFN γ 의 생성 정도를 정량하여 보았다. 위와 같이 처리된 여러 군의 마우스로부터 비장세포를 얻고 이를 모델 항원인 OVA를 100ug/ml 의 농도로 37도에서 culture하였다. 72시간 후에 상등액을 harvest하여 영하 20도에서 보관하여 두었다가 정량하였다.

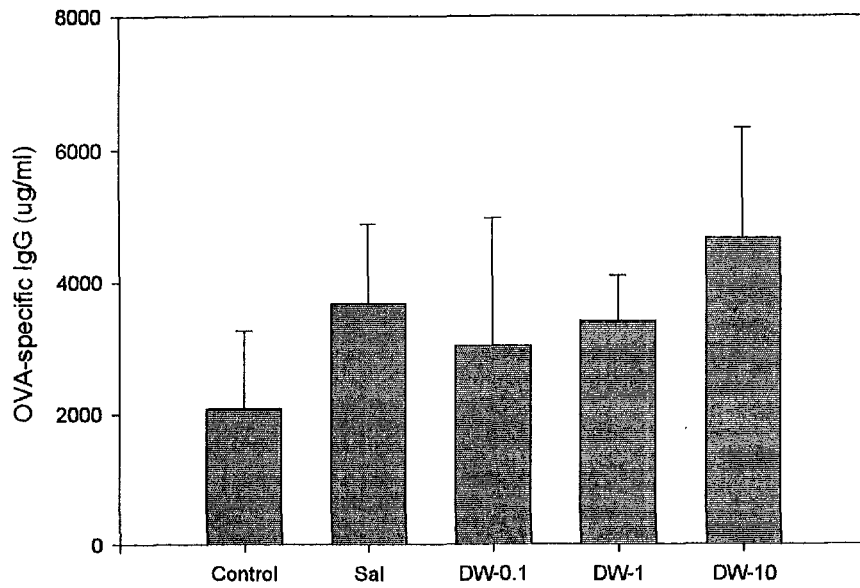


Fig 18. Effect of different dose of DW-DNA and salmon DNA on IgG production

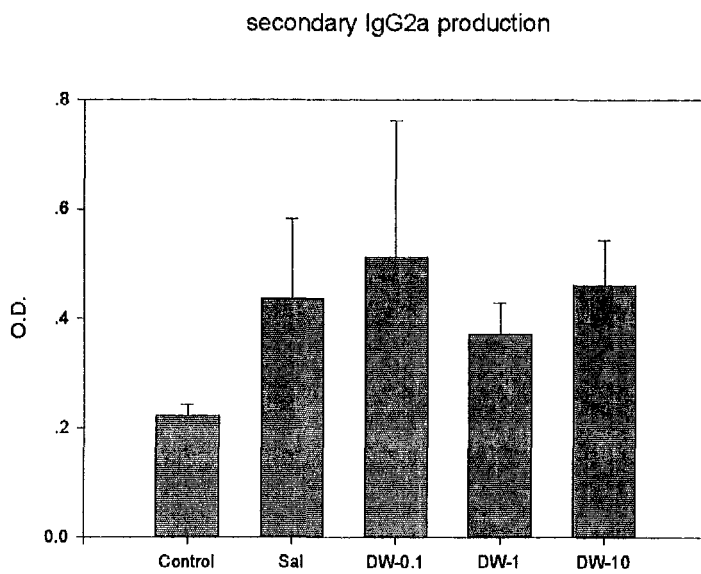
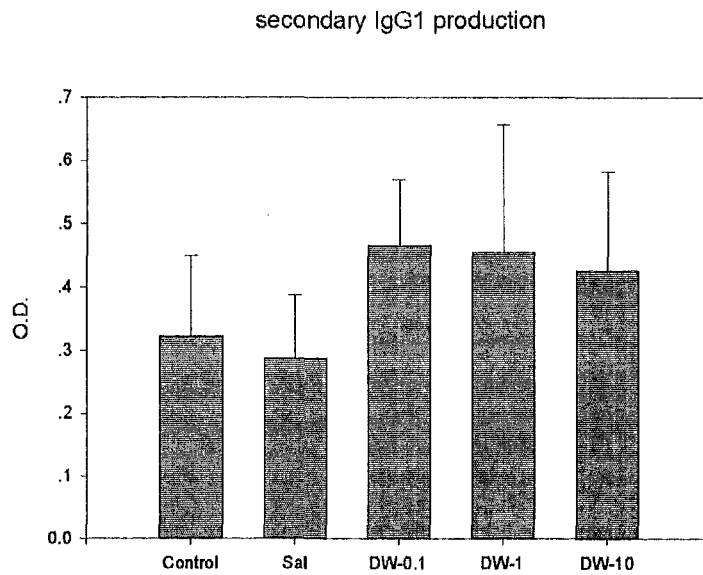


Fig 19. Effects of different dose of DW-DNA and salmon DNA on each type of secondary IgG production

IFN gamma의 정량은 sandwich ELISA 방법을 사용하였다. Fig 20에서 볼 수 있듯이 Th1 cytokine인 IFN gamma의 생성은 대조군과 비교하여 볼 때 DW-DNA를 처리한 모든 군에서 증가함을 관찰할 수 있었고 그 정도는 약 2배였다. 이러한 결과는 Th1 반응의 다른 지표인 IgG2a의 생성과 일치함을 보여준다. 그 경향은 IgG2a의 생성과 마찬가지로 0.1mg-10mg/0.5ml의 DW-DNA의 농도에서는 모두 비슷한 것으로 판단된다. 연어백자를 투여한 군에서는 대조군과 비슷한 정도로 IFN gamma가 생성되었다.

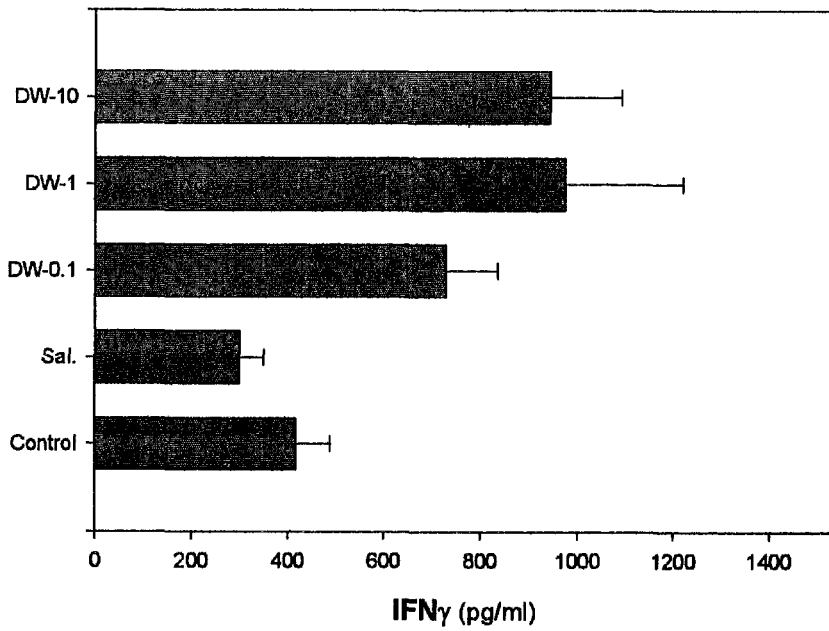


Fig 20. Effect of DW-DNA and salmon DNA on interferon gamma production

3. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응 연구

가. 양적혈구에 대한 지연형 과민반응의 유도 및 측정

DW-DNA의 경구투여가 양적혈구에 의해 유도된 지연형 과민반응에 미치는 영향을 알아보려고 6주령의 female BALB/c 마우스를 사용하였다. 다섯 마리의 마우스를 한 군으로 한다. DW-DNA와 연어 백자 추출물을 1mg/0.5ml의 농도가 되도록 섞어 60°C에서 PBS buffer에 각각 녹여 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였다. 대조군의 마우스에는 PBS를 0.5ml씩 경구투여 하였다. 투여한 지 5일, 19일 후에 OVA를 20ug씩 freund adjuvant에 유탁하여 intraperitoneal injection 하였다. 마지막 injection 후 왼쪽 혹은 오른쪽 pinnae 부분에 각각 OVA 10ug 혹은 PBS 10ul를 subcutaneous injection하고 24시간 48시간 72시간에 각각 주사 부위의 swollen 두께를 측정하였다. OVA를 주사한 왼쪽 귀의 pinnae에서 PBS를 주사한 오른쪽 귀의 pinnae 두께를 뺀 값을 지연형 과민반응에 의한 ear thickness로 계산하였다.

Fig 21에서 나타나는 바와 같이 24시간 후의 ear thickness는 약 0.54mm 정도였고 DW-DNA나 연어백자 추출물을 경구투여한 군과 대조군에서 비슷한 정도로 지연형 과민반응이 유도되었다. 48시간 후에는 전체적으로 0.62mm 정도의 ear thickness를 나타내었고 72시간 후에는 0.55mm 정도로 지연형 과민반응이 측정되는 것으로 보아 지연형 과민반응에 의한 ear thickness는 항원을 주사한 후 24시간에서 48시간 사이에서 최대값을 보이다가 그 후 약간 줄어드는 경향을 보였다. Ear thickness를 측정한 24시간, 48시간, 72시간에 있어서 각 그룹간에는 지연형 과민반응이 비슷한 정도로 유도되었다고 판단된다.

지연형 반응이 DW-DNA의 용량에 의존적으로 잘 일어나는지를 알아보기 위하여 위와 같은 실험을 용량을 달리하여 비교하였다. DW-DNA를 0.2mg, 1mg, 5mg/0.5ml PBS에 잘 녹인 후에 0.5ml씩 이틀간격으로 다섯 번 경구투여 하였고 대조군의 마우스에는 PBS를 0.5ml씩 경구투여 하였다. 투여한 지 5일, 19일 후에 OVA를 20ug씩 freund adjuvant에 유탁하여 intraperitoneal injection 하였다. 마지막 injection 후 왼쪽 혹은 오른쪽 pinnae 부분에 각각 OVA 10 μ g 혹은 PBS 10 μ l를 subcutaneous injection 하고 24시간에 주사 부위의 swollen 두께를 측정하였다.

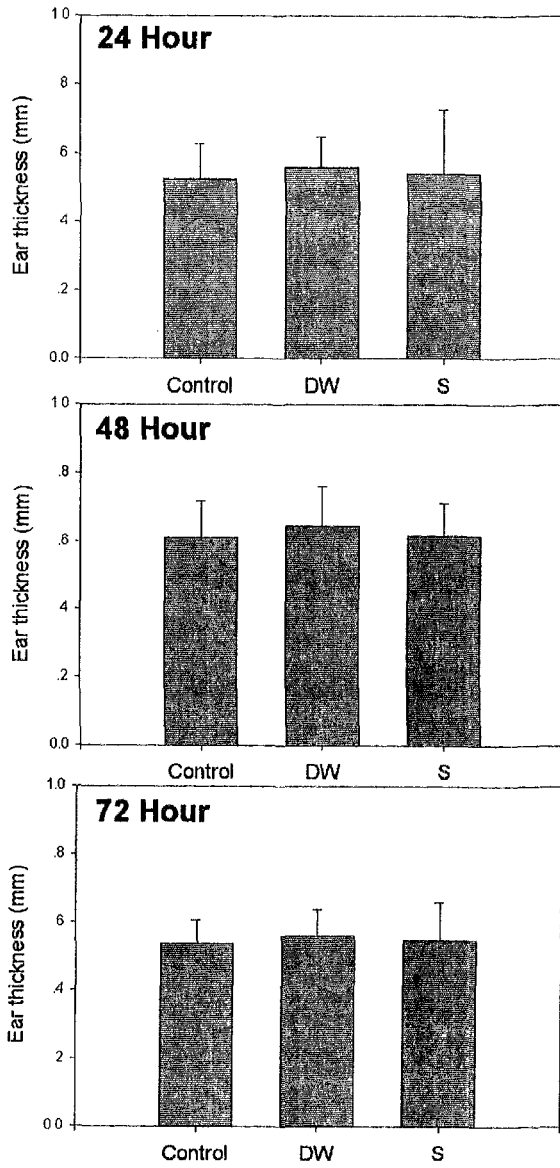


Fig 21. Delayed type hypersensitivity in DW-DNA or Salmon DNA fed mice

Fig 22에서는 각 용량의 DW-DNA 투여 후 지연형 과민반응의 정도를 나타낸 것이다. Fig 22에서 볼 수 있듯이 대조군에 비하여 DW-DNA를 투여하였을 때 어느 용량에서도 지연형 과민반응의 증가 혹은 감소가 관찰되지 않았다. 0.2mg 혹은 1mg을 투여한 군에서 약간 증가되는 것처럼 나타났지만 통계적으로 의미없는 차이인 것으로 분석되었다. 종합적으로, 그림 21과 그림 22는 DW-DNA의 투여가 지연형 과민반응을 유도하는 처리에 의한 ear thickness 에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 말하여 주고 있다.

지연형 과민반응의 양상을 비교하기 위하여 항원에 대한 체액성 면역반응을 조사하였다. OVA를 96well ELISA plate에 coating한 후 1% BSA blocking buffer로 150ul/well 씩 넣고 실온에서 30분간 blocking 하고, 0.1% BSA dilution buffer로 dilution된 serum을 100 μ l 씩 well에 넣고 4도에서 overnight 반응하였다. 각각의 plate를 Goat-anti-mouse IgM-AP, Goat-anti-mouse IgG-AP를 1:2000으로 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응한 뒤 alkaline phosphatase 효소의 substrate 인 pNPP를 넣어 발색을 확인하고 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Fig 23에서는 지연형 과민반응 처리 후의 항원에 대한 체액성 면역반응을 나타낸 것이다. 대조군에 비하여 DW-DNA의 투여군에서 항원 특이적인 IgG의 생성이 현저하게 증가하였다. 이것은 DW-DNA가 항원에 의해 유도되는 면역반응 중 체액성 면역반응이 증가하였다는 것을 의미하고 이는 전년도 과제의 결과와 일치하였다. 그 양상은 IgG2a가 증가한 것으로 분석되었다. Salmon-DNA를 투여한 군에서도 IgG의 생성이 증가된 것이 관찰되었고 그 정도는 DW-DNA의 그것과 비슷하였다. 즉 DW-DNA 혹은 Salmon-DNA에 의해서 지연형 과민반응의 유도처리에 의한 체액성 면역반응이 더 강한 정도로 일어난다고 분석된다.

나. 지연형 과민반응의 양상 분석

양적혈구에 대한 세포성 면역반응의 정도는 비장세포 proliferation assay와 cytokine assay로 평가하였다. 항원을 투여한 지 7일 후에 비장세포를 얻어 5×10^5 /well 혹은 5×10^6 /well이 되도록 항원으로 자극시켜주며 배양하고, 최종 20시간

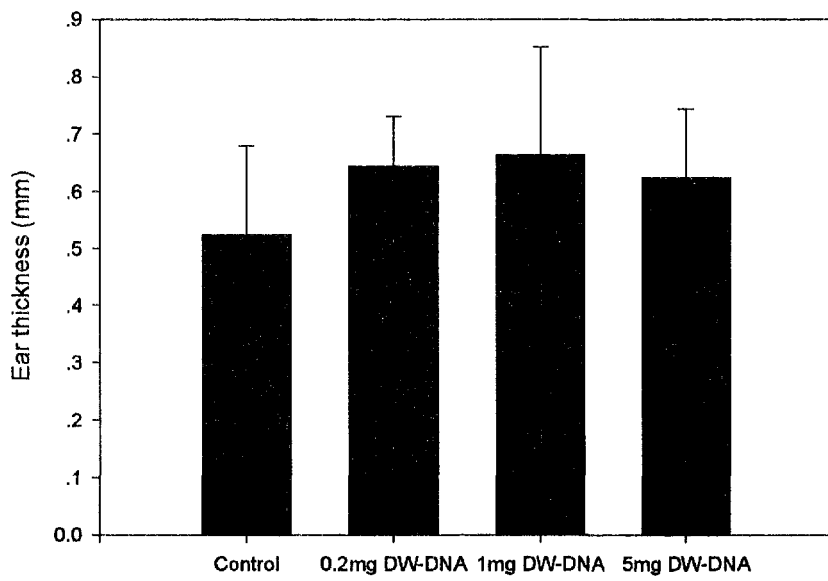


Fig 22. Ear thickness after administration of various dose of DW-DNA

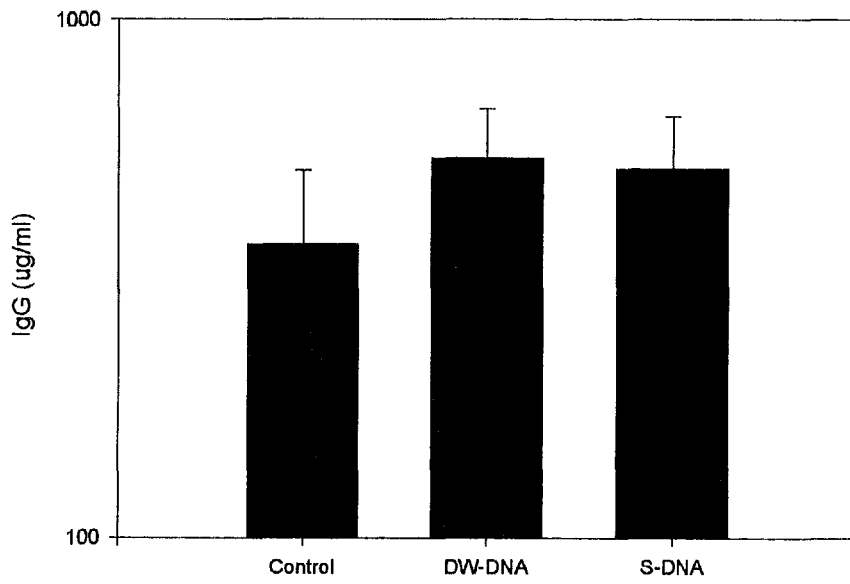


Fig 23. Effect of DW-DNA or Salmon-DNA on humoral response after DTH treatment

동안 ^3H Thymidine로 pulse하여 96시간 후 세포를 수확하고 proliferation 정도를 beta-counter를 이용하여 측정하였다. 배양 72시간 후에 상등액을 얻어 cytokine assay에 사용하였다.

Fig 24에서는 항원에 대한 비장세포의 proliferation을 나타내고 있다. 대조군에 비하여 DW-DNA를 투여하였을 때 비장세포의 proliferation이 더욱 왕성해졌다. 이것은 DW-DNA 투여가 지연형 과민반응의 처리에 의한 세포성 면역반응을 더욱 강하게 유도한다는 것을 보여주고 있다. 흥미롭게도 이러한 경향은 DW-DNA 투여에 의해서만 유도되고 Salmon-DNA를 투여했을 때에는 대조군과 별 차이를 보이지 못하였다. 그러나, Fig 21과 Fig 22에서 보듯이 이러한 체액성 면역반응의 증가는 지연형 과민반응의 척도인 ear swelling에는 영향을 주지 못하는 정도의 반응성 증가로 결론지을 수 있다.

상층액 중의 cytokine 측정은 sandwich ELISA 방법을 사용하였다. 먼저 항 IFN gamma 단클론 항체를 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 coating 한 후 측정하고자 하는 샘플을 적절한 비율로 희석하여 각 well에 50-100 μl 씩 분주하여 실온에서 2시간 또는 섭씨 4°C 에서 overnight incubation하였다. Biotinylated anti-IFN gamma Ab를 dilution buffer로 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 분주한 후 실온에서 2시간 동안 방치한 후 Streptavidin-HRP 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 분주하였다. OPD용액을 각 well당 100 μl 씩 분주한 후 30분간 반응시키고 흡광도를 측정하였고 recombinant murine IFN gamma를 이용하여 정량하였다.

Fig 25에서는 지연형 과민반응 유도 후 비장세포에서 생성되는 IFN gamma의 양을 정량한 값이다. IFN gamma의 생성은 DW-DNA의 투여에 의하여 유의성 있게 증가하였다. 그러나 Salmon-DNA의 투여는 IFN gamma의 생성에 영향을 주지는 못하였다. 이것은 지연형 과민반응의 유도 처리에 의한 면역반응의 진행 과정이 DW-DNA의 전투여에 의해 Th1 반응쪽으로 약간 강한 반응이 진행되었다는 것을 보여주고 있다. 이것은 Salmon-DNA 투여에 의해서는 나타나지 않는 DW-DNA 투여군만의 특성으로 판단된다.

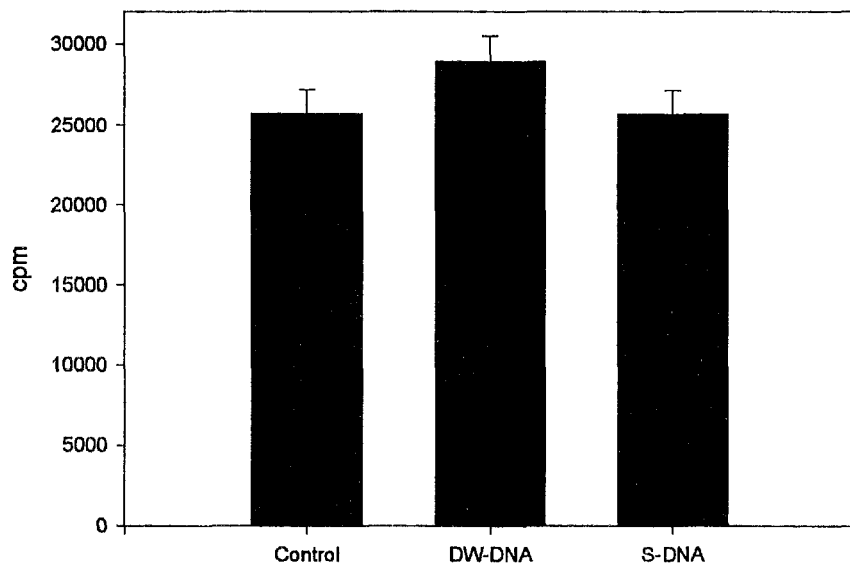


Fig 24. Effects of DW-DNA or Salmon-DNA on T cell proliferation after DTH treatment

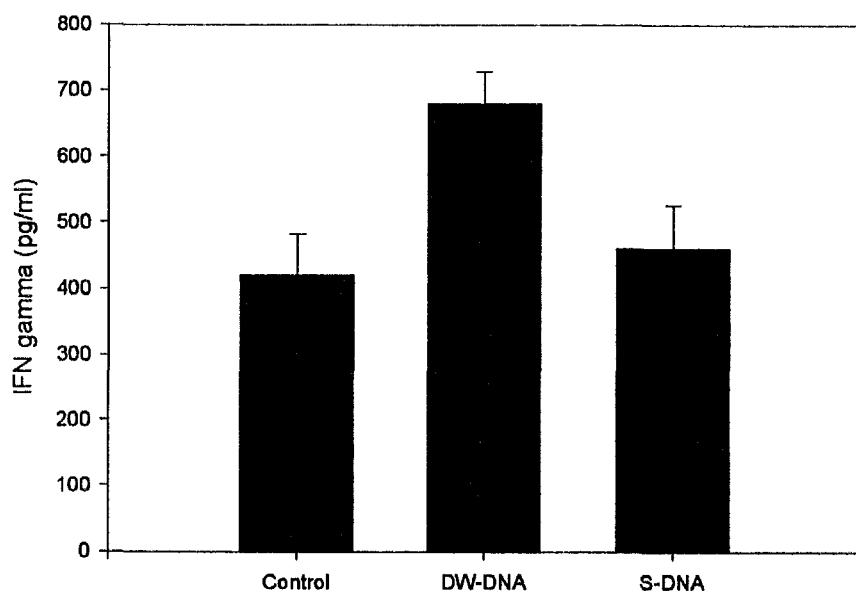


Fig 25. Effects of DW-DNA or Salmon-DNA on IFN gamma production after DTH treatment

다. 지연형 과민반응의 주요세포 분석

지연형 과민반응을 유도하여 swollen 부분을 절개해 내고 분리된 세포를 flow cytometer를 이용하여 세포를 분석하였다. 분석의 대상이 되는 세포는 macrophage, T cell (CD4+, CD8+), 그리고 natural killer cell로 하였다. 각 세포 분석에 사용된 항체는 F4/80 (anti-Macrophage), GK1.5 (anti-CD4), 3.168 (anti-CD8), PK136 (anti-NK cell)로 이들에 의해 flow cytometer 로 세포의 종류를 확인하였다.

Fig 26은 각 cell의 marker에 대한 단클론 항체로 세포의 종류를 분석한 결과이다. Fig 21에서 보는 바와 같이 swollen 부위에 모여든 면역세포는 macrophage가 27% 정도인 것으로 나타났다. DW-DNA를 투여한 군에서는 macrophage의 비율이 32% 정도로 약간 증가하였다. 이러한 macrophage의 증가는 연어백자 추출물에 비하여 DW-DNA가 지연형 과민반응을 유도하는데 있어서 macrophage의 활성을 높인 결과라고 분석된다. 그러나, 그 증가정도는 대조군에 비하여 10-20% 정도이고 통계적으로 유의성있는 차이를 나타내지는 못하였다. CD4+ T cell, CD8+ T cell의 비율은 5-8% 정도로 대조군과 DW-DNA 투여군에서 모두 비슷하게 측정되었다. CD8+ T cell의 경우 DW-DNA를 투여한 군에서 그 비율이 대조군보다 약간 증가하였다. (1.5% 증가) NK cell의 경우는 DW-DNA 투여군, 대조군에서 1% 미만으로 측정되었다.

지연형 과민반응에 관여하는 세포의 절대적 수를 flow cytometer와 cell counting으로 측정해 보았다. Fig 27에서는 각 세포의 수를 DW-DNA 투여군과 대조군에서 비교한 것이다. Fig 27에서 볼 수 있듯이 macrophage의 경우 DW-DNA를 투여한 군에서 지연형 과민반응에 관여하는 세포의 수가 대조군에 비하여 25% 정도 증가한 것이 관찰되었다. 그러나, 이러한 macrophage 세포의 수 증가는 swollen 부위에 영향을 미치지 못하는 못하였다. CD4+ T cell, CD8+ T cell 그리고 natural killer cell의 경우는 DW-DNA를 투여한 군에서 대조군보다 미약한 정도로 세포수가 증가하였지만 통계적으로 의미있는 차이를 보이지는 못하였다.

라. 지연형 과민반응의 병원균에의 적용

지연형 과민반응의 세포성 면역반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 two way mixed lymphocyte reaction을 수행하였다. BALB/c mouse와 C57/BL6 mouse로부터 비장을 각각 꺼내어 single cell suspension을 얻은 후 이를 동수로 섞어 반응하였다.

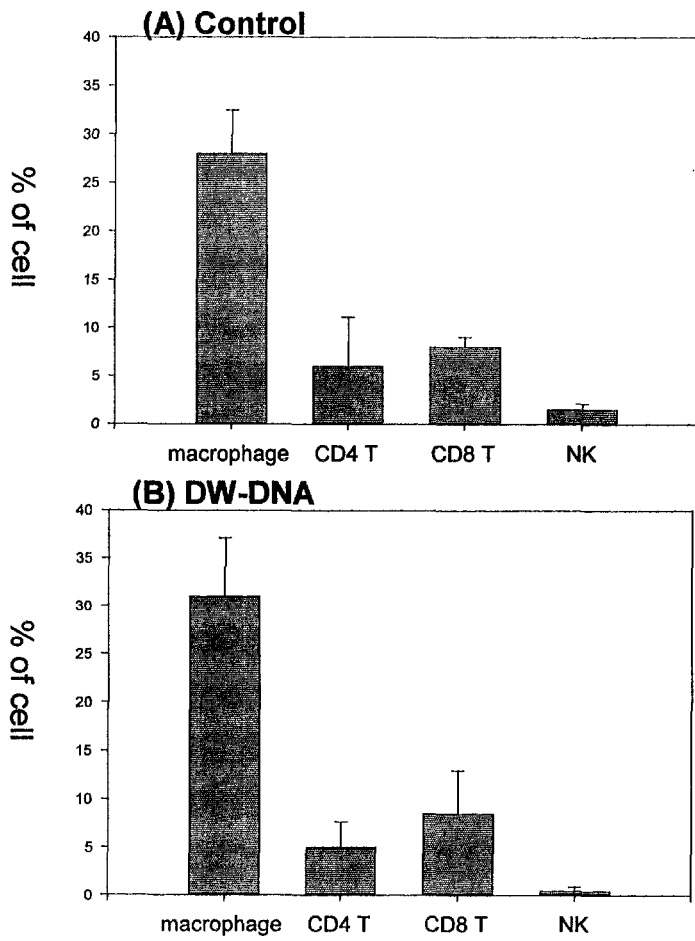


Fig 26. Analysis of cell population in the swollen tissue caused by DTH

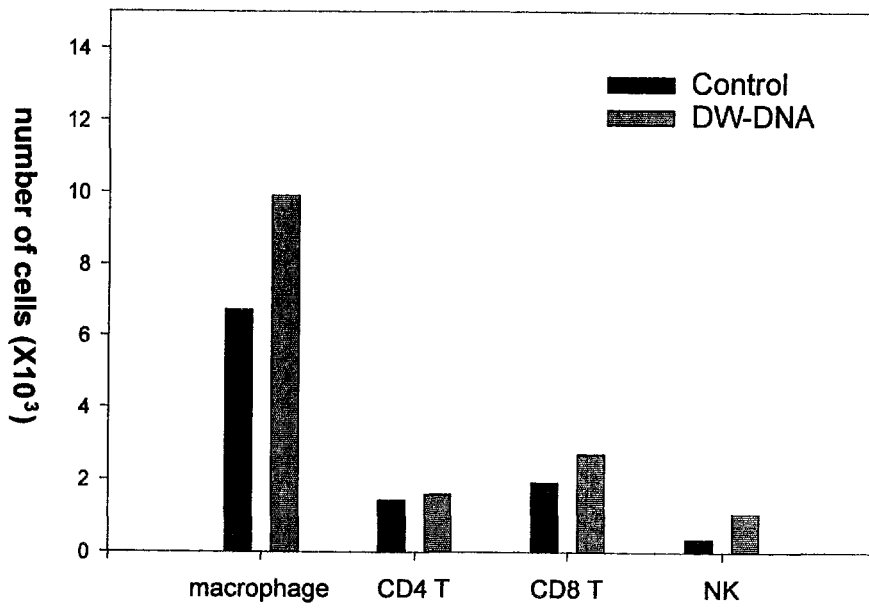


Fig 27. Absolute number of each cell population in swollen tissue

이들 종의 마우스는 각기 다른 MHC type을 소유하고 있기 때문에 서로의 MHC를 인식하는 세포에 의해 proliferation 이 일어난다. 반응 초기에 DW-DNA를 농도별로 넣어 반응에 미치는 DW-DNA의 영향을 분석하였다. 동위원소로 표지된 Thymidine을 harvest 하기 24시간 전에 넣어 proliferation을 측정하였다. 반응시간을 다양하게 하여 분석하기 위하여 72시간, 96시간, 120 시간동안 반응을 하였다.

각 시간별로 측정한 proliferation의 정도를 Fig 28, 29, 30에 나타내었다. Fig 28에서는 72시간 반응 했을 때의 mixed lymphocyte reaction (MLR) 반응을 측정한 것이다. Fig 28에서 볼 수 있듯이 MLR은 DW-DNA를 넣어 주었을 때 농도 의존적으로 그 정도가 증가하였다. 증가 경향은 0.01 μ g/ml-100 μ g/ml의 범위에서 유의성 있게 증가되었음을 관찰 할 수 있었다. Fig 29에서는 96시간 후의 MLR 반응을 측정한 것이다. 반응 정도가 72 시간에 비하여 약하게 나타난 것을 관찰 할 수 있다. 반응의 경향은 72시간 반응했을 때와 비슷하게 관찰되었다. Fig 30에서는 120시간 후의 MLR반응을 측정한 것이다. 반응 정도가 72시간, 96시간에 비하여 훨씬 약하게 나타났다. 반응의 경향은 0.01 μ g/ml-1 μ g/ml 의 범위에서는 농도 의존적으로 나타났지만 1 μ g/ml-100 μ g/ml의 범위에서는 비슷하게 관찰되었다.

이러한 two way MLR 반응의 증가는 여러 요인으로 분석될 수 있다. 첫째, DW-DNA가 MLR반응의 responder cell을 자극시키거나 stimulator를 자극하여 반응이 활발하게 일어났을 가능성이 있다. 이러한 분석은 DW-DNA가 세포성 면역반응을 증가시킬 수 있다는 가능성을 나타낸다. 둘째, DW-DNA가 MLR 반응에서 상대의 MHC 분자를 인식하여 반응한 것과 무관하게 DW-DNA를 항원으로 인식하여 자신의 T cell과 antigen presenting cell에 의한 proliferation에 관여할 가능성이 있다. 셋째, DW-DNA가 T cell과 antigen presenting cell의 반응 말고 mitogen 처럼 직접 cell의 proliferation에 관여했을 가능성이 있다.

이러한 가능성을 확인하기 위하여 in vivo에서 DW-DNA를 투여 후 MLR을 측정하였다. C57BL/6 마우스를 responder 마우스로 사용하였다. 이 마우스에 DW-DNA를 200 μ g이 되도록 PBS에 녹여서 복강투여 하였다. 일주일 후 비장세포를 꺼내어 single cell suspension으로 만들었다. responder 마우스로는 BALB/c 마우스를 사용하였다. naive BALB/c 마우스의 비장세포를 꺼내어 single cell suspension으로 만들고 mitomycin C를 이용하여 cell proliferation 성질을 제거한 후 사용하였다. Fig 31에서 볼 수 있듯이 대조군에 비하여 DW-DNA를 투여한 군에서 proliferation이

증가하였음을 알 수 있고 그 정도는 30-40%정도였다. 이것은 two way MLR에서의 증가정도와 비교할 때 현저히 낮은 정도이지만 대조군과 비교해서 여전히 의미있는 차이를 보인다고 분석된다. 연어백자 추출물을 사용하였을 때에도 비슷한 정도의 증가를 보인다. Two way MLR의 결과와 종합하여 볼때 DW-DNA의 투여에 의하여 in vitro와 in vivo에서 모두 세포성 면역반응의 활성이 증가되었다고 분석할 수 있다. 그러나 이러한 경향은 DW-DNA의 투여에 의한 특이한 현상은 아니며 연어백자 추출물을 적용하였을 때에도 비슷한 경향을 관찰할 수 있었다.

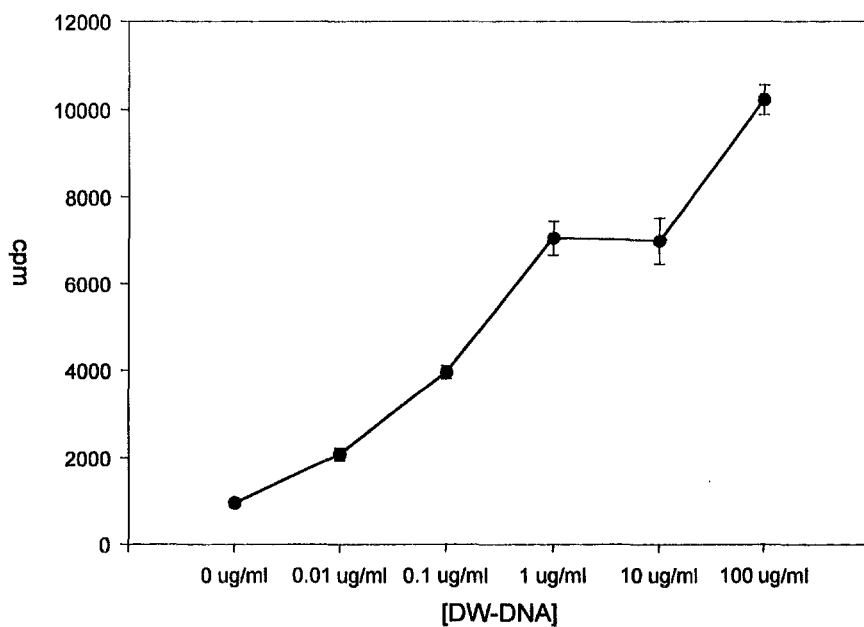


Fig 28. Two way MLR after 72 hour with increasing concentration of DW-DNA

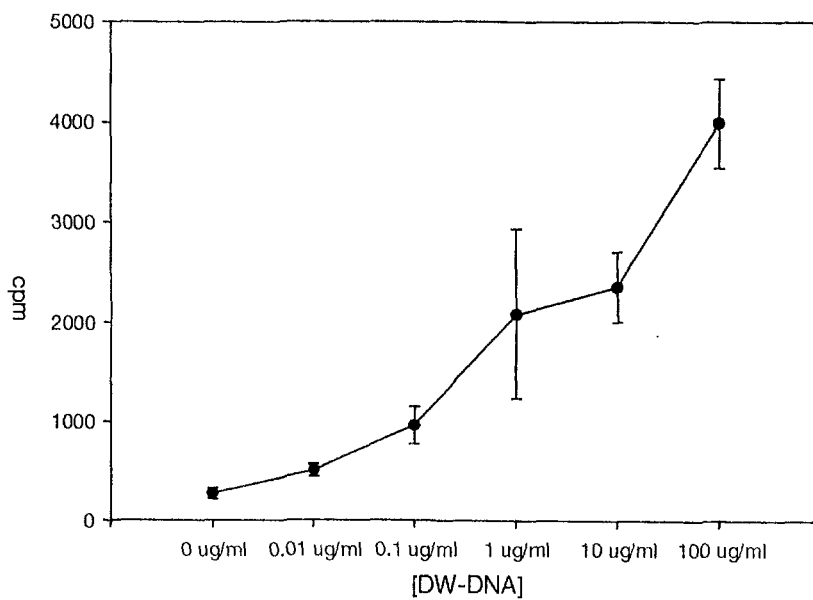


Fig 29. Two way MLR after 96 hour with increasing concentration of DW-DNA

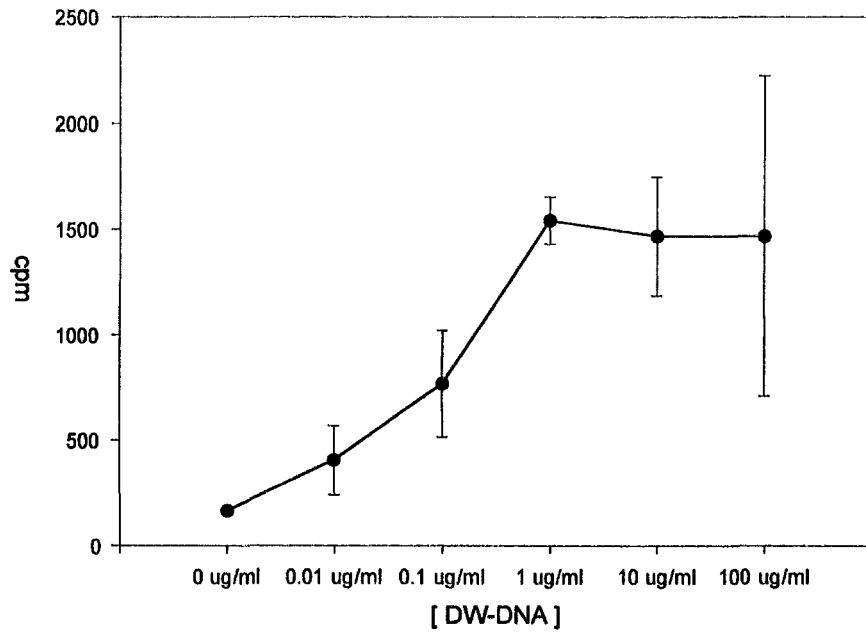


Fig 30. Two way MLR after 120 hour with increasing concentration of DW-DNA

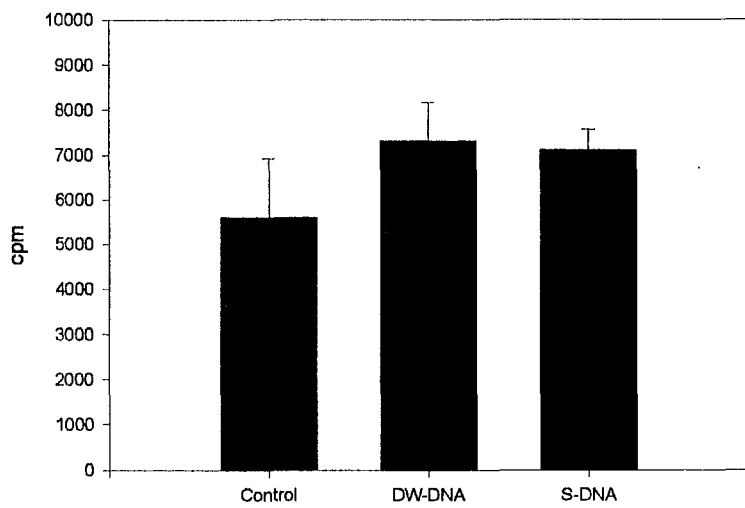


Fig 31. Effect of DW-DNA on one-way MLR

제 3절 항피로 및 학습능력 향상 효과에 대한 연구

1. 근육의 항피로 효과 연구

검체 DW-DNA 100 및 200 mg/kg을 경구투여하고, 수욕(15℃)상에 마우스를 거꾸로 매달아 마우스의 피로가 최대로 되어 머리가 물 속에 잠기는 시간을 측정한 결과를 Table 11에 나타내었다. 즉, 검체 100, 200mg/kg 투여군에서는 32.4%, 20.1%의 항피로 효과를 나타내었다. 골격근 강화 작용이 있는 oxymetholone 50 mg/kg의 투여시 항피로 효과가 15.4%에 비하여 항피로 효과가 증가하였으나 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

Table 11. Antifatigue effect of DW-DNA in mice

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of mice	Working capacity (min)	Increase (%)
Control	—	10	1419.6±179.4	—
DW-DNA	100	10	1879.0±300.8	32.4
	200	10	1704.6±249.4	20.1
Oxymetholone	100	10	1638.5±107.1	15.4

2. 중량부하 동물의 유영 지속 실험

마우스 꼬리에 체중의 5%에 해당하는 중량을 부가하고, 검체인 핵산복합물질 (DW-DNA)의 투여량 50, 100 및 200 mg/kg의 경구용량에서 유영실험(35℃)을 실시한 결과를 Table 12에 나타내었다. DW-DNA 50 및 100 mg/kg의 용량에서는 유영지속시간이 15.4%, 21.7% 증가경향을 보였으나, 대조군에 비하여 유의성 있는 증가는 나타나지 않았다. 그러나 200 mg/kg의 용량에서는 28.7% 유영지속시간이 증가함으로 대조군과 유의성을 나타내었다. 반면, 골격근 강화 작용이 있는 oxymetholone은 50 mg/kg에서 증가 경향만을 나타내었으나 유의적인 것은 아니었다.

Table 12. Prolongation effect of DW-DNA on swimming in weight-loaded rats

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of mice	Swimming time (min)	Increase (%)
Control	—	10	298.3±22.0	—
DW-DNA	50	10	344.2±23.2	15.4
	100	10	363.0±32.4	21.7
	200	10	383.9±26.2*	28.7
Oxymetholone	50	10	346.1±23.4	16.0

Significantly different from control group (*: $p < 0.05$)

3. 격일 절식동물의 지구력 실험

격일간 2회 절식한 생쥐에 2일간 시료를 투여하고, 다음날 시험 시작 30분전에 투여하여 rota-rod 장치에서 실험하였다. 회전 속도는 35rpm으로 고르게 선별 한 후, 40rpm에서 실험을 실시하였으며 회전봉 위에서 떨어질 때까지의 시간을 측정한 결과는 Table 13에 나타내었다. 즉, 검체 50 및 100mg/kg의 투여시 회전봉에서 지탱하는 시간이 유의성은 나타내지 않았으나, 각각 30.7%, 12.2%의 지구력 증가 효과를 나타내었으며, 200mg/kg의 용량에서는 53%의 지구력 증가 효과를 나타냄으로써 유의성이 인정되었다. 또 대조물질인 oxymetholone도 100mg/kg의 용량에서 유의적인 지구력 증강 효과를 나타내었다.

4. T-미로에서의 기억 능력 실험

Sato 등의 방법에 따라 T-미로장치를 이용하여 흰쥐를 직선 코스에서 1일 5회 3일간 유영시키고, T-미로에서 1일 5회 3일간 T-미로의 출발지점(S)에서 유영을 시작하여 목적지(G)까지의 유영 시간을 측정하고 무효지점으로의 실수 회수를 측정한 결과는 Table 14와 15에 나타내었다.

Table 13. Effects of DW-DNA on persistency of mice on rota-rod test

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of mice	Persistent time (sec)		
			Before treatment	After treatment	Increase (%)
Control	—	20	1267.6±254.1	1865.9±481.8	—
DW-DNA	50	20	1267.2±214.3	2515.2±291.5	30.7
	100	20	1311.7±316.3	2160.1±604.8	12.2
	200	20	1324.6±222.7	2945.4±331.8*	53.0
Oxymetholone	100	20	1306.8±224.0	2985.8±371.9*	55.1

Significantly different from control group (*: p<0.05)

즉, T-미로에서 출발지점에서 목적지까지의 유영시간은 검체(DW-DNA) 100mg/kg를 투여한 군에서 4, 6, 13, 14, 15회에서 유의적으로 단축하였으며, 150mg/kg 투여 군에서는 4, 6, 12, 13, 14, 15회에서 유의적으로 단축하였다. 또한 200mg/kg 투여 군에서도 13, 15회에서 유의적으로 단축되었다. 그러나 T-미로에서 무효지점으로의 실수 회수는 검체와 대조약물 모두 대조군과 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았다.

Table 15. Effect of DW-DNA on swimming time in the T-Maze of rats

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of rats	Swimming time(sec)				
			1 day (Number of trials)				
			1	2	3	4	5
Control	—	7	80.9±25.5	95.1±23.1	77.0±15.3	76.1±8.7	44.1±7.7
DW-DNA	100	7	75.4±14.7	51.1±10.8	49.4±13.4	32.6±8.3**	35.9±4.0
	150	7	47.4±10.1	98.7±37.2	73.6±14.6	33.6±7.2**	42.7±10.6
	200	7	66.0±18.8	56.8±17.1	50.3±9.9	58.5±7.2	47.8±4.9
Caffeine	30	7	116.0±33.9	120.7±37.3	68.3±14.6	28.8±3.9***	43.7±12.9
2 day (Number of trials)			6	7	8	9	10
Control	—	7	151.3±22.9	65.6±9.5	78.1±14.4	49.0±6.8	52.6±14.0
DW-DNA	100	7	91.1±21.3	47.4±6.6	48.3±8.3	37.3±5.0	46.1±10.6
	150	7	65.7±9.1**	56.4±9.8	43.3±6.4	43.4±7.2	35.6±5.2
	200	7	88.0±24.0	48.0±8.9	41.8±10.5	41.5±7.3	30.2±3.3
Caffeine	30	7	117.8±27.6	46.7±6.9	58.2±21.6	55.8±14.6	44.7±10.4
3 day (Number of trials)			11	12	13	14	15
Control	—	7	57.3±3.9	61.1±9.8	64.1±8.3	72.0±9.4	51.4±3.4
DW-DNA	100	7	49.9±7.0	47.6±8.6	31.6±4.7**	35.4±6.9*	26.3±5.9**
	150	7	62.3±10.8	28.4±5.2*	38.1±4.9*	44.0±4.3*	32.9±3.6**
	200	7	35.3±8.4	40.7±6.0	34.2±5.7*	45.3±10.9	30.3±5.3**
Caffeine	30	7	45.7±12.8	40.0±7.3	29.8±6.7*	31.7±6.2**	43.2±12.7

Table 16. Effect of DW-DNA on the number of errors during swimming time of rats in the T-Maze

Treatment	Dose (mg/kg, po)	No. of rats	Number of Errors				
			1 day (Number of trials)				
			1	2	3	4	5
Control	—	7	6.3±2.0	5.5±1.8	2.9±1.0	3.5±1.3	0.6±0.2
DW-DNA	100	7	4.6±1.0	2.5±0.5	1.6±0.8	0.8±0.3	0.8±0.5
	150	7	5.3±1.0	5.5±1.8	3.6±1.2	1.5±0.7	1.3±0.9
	200	7	5.8±1.0	2.5±0.9	1.9±0.6	1.6±1.0	1.3±0.6
Caffeine	30	7	4.4±1.4	6.6±1.0	3.1±0.9	1.0±0.5	2.1±0.9
2 day (Number of trials)			1	2	3	4	5
Control	—	7	6.0±2.0	1.8±0.9	0.6±0.6	0.3±0.2	0.1±0.1
DW-DNA	100	7	3.3±1.0	1.1±0.6	0.8±0.3	0.4±0.3	0.6±0.6
	150	7	3.1±0.9	1.4±0.8	1.1±0.7	1.1±0.9	0.3±0.2
	200	7	4.0±1.1	1.6±0.5	0.5±0.4	0.9±0.5	0.5±0.3
Caffeine	30	7	6.4±1.2	1.9±0.6	2.1±1.1	1.3±0.5	1.0±0.9
3 day (Number of trials)			1	2	3	4	5
Control	—	7	0.9±0.4	0.3±0.2	0.4±0.2	0.3±0.1	0.3±0.3
DW-DNA	100	7	2.3±1.0	1.5±0.6	0.8±0.3	0.4±0.3	0.1±0.1
	150	7	1.5±0.5	0.4±0.3	0.1±0.1	0.0±0.0	0.1±0.1
	200	7	1.1±0.4	0.8±0.4	0.4±0.3	0.3±0.2	0.4±0.2
Caffeine	30	7	1.1±0.5	1.1±0.5	0.9±0.4	0.6±0.4	0.8±0.5

제 4절 hexan복합물질의 항산화 효과에 대한 연구

1. 실험동물을 이용한 생체내 산화적 손상에 대한 보호효과

가. 사염화탄소 유도에 의한 산화적 손상 보호효과

사염화탄소는 간의 약물대사 효소 중 특히 cytochrome P450 2E1에 의해 대사 되는 과정에서 oxidative stress를 유발하고 지질 과산화 및 간독성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히, 사염화탄소의 bioactivation으로 생성되는 반응성이 강한 trichloromethyl 또는 trichloromethyl peroxy free radical이 생체내 고분자인 단백질, 지방 등을 공격하는 것으로 보고되어왔다. 본 실험에서는 이러한 free radicals에 의해 지질막의 불포화지방산들이 산화적 분해를 일으키는 지질 과산화 반응을 malondialdehyde를 지표로, 간독성 지표로는 ALT 및 AST의 활성을 측정하였다. ALT와 AST는 간세포가 손상을 받은 경우 혈액으로 배출되므로 사염화탄소로 인한 간 손상의 지표로 사용 가능하다. 실제, 사염화탄소는 SD rat에서 용량(0, 0.4, 0.6, 0.8ml/kg) 의존적으로 지질 과산화 및 간독성을 일으켰으며, 참치 정소로부터 추출한 hexan 복합물질 50mg/kg/day을 1, 3, 5일 동안 경구로 투여한 결과 지질 과산화는 현저히 최대 50% 정도 억제되었다(Fig 32). 간독성 지표인 ALT, AST의 활성을 비교한 경우 지질 과산화 반응의 경우보다는 약하지만, 20-30% 정도 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig 33). 이상의 결과로, 참치 정소로부터 추출한 hexan 복합물질은 in vivo SD rat 모델에서, 사염화탄소로 유도한 생체내 산화적 손상에 대해 보호효과를 가진다고 할 수 있겠다.

나. NO donor에 의한 산화적 손상 유도

신경전달, 혈관확장, 염증작용 등 다양한 생리적 기능을 매개한다고 알려진 신호전달 물질의 일종인 NO (nitric oxide)는 과량으로 생성되는 경우 세포독성이나 유전독성을 나타내며, 특히 활성산소종의 하나인 superoxide anion과 반응을 하는 경우 더욱더 강력한 산화제인 peroxynitrite를 형성하여 세포 독성 및 사멸을 유도

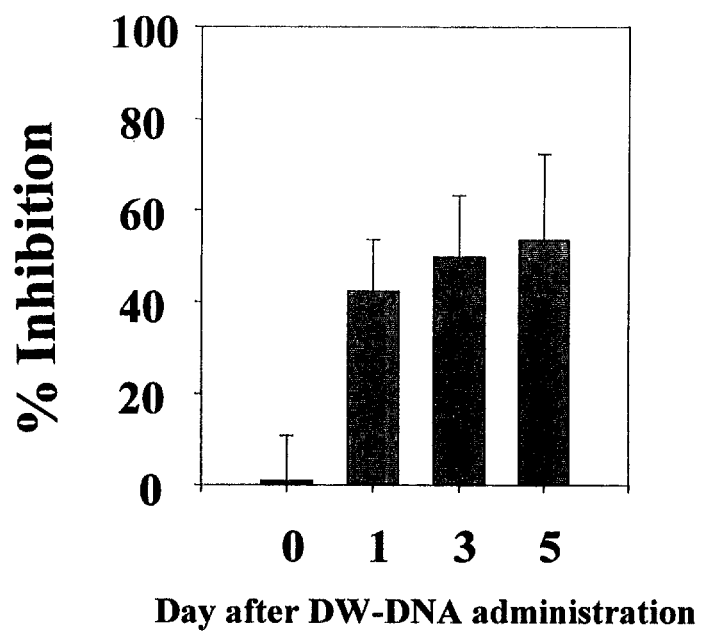


Fig 32. Effect of nucleic acid complex from tuna spermary on CC14-induced lipid peroxidation in rat liver(TBA assay)

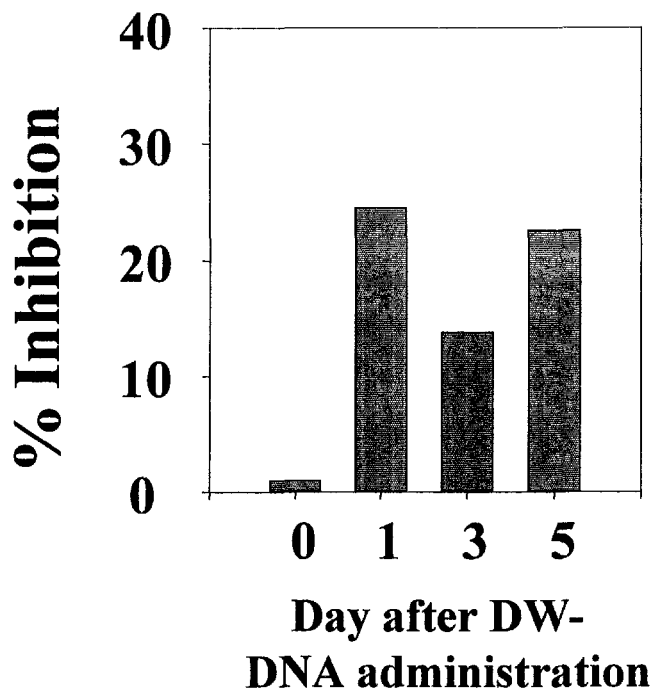


Fig 33. Effect of nucleic acid complex from tuna spermary on CC14-induced hepatotoxicity (ALT and AST assay)

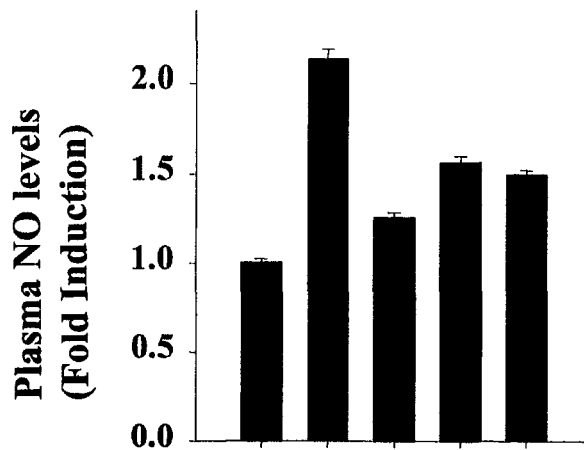
한다. 특히 다량으로 생성된 peroxynitrite는 생체 내 지방, 단백질, 유전자 등과 같은 거대 분자들과 반응을 하여 비가역적인 산화적 손상을 유발한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 체중 200g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 랫드를 실험동물로 하여 NO donor로 SIN-1(3-morphosydnonimine)과 LPS(lipopolysaccharide)를 복강으로 투여하여 생체내 산화적 손상을 유발하였다. 실험동물은 5개의 그룹으로 나누어, 정상군에는 생리식염수를, NO donor를 투여하는 군에는 0, 1, 3, 5 일 동안 미리 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질 (50mg/kg/day)을 경구로 투여하였다.

다. Nitrite assay

NO는 oxygen 존재 하에서 빠르게 nitrite 및 nitrate를 형성하며, nitrite/nitrate를 포함하는 시료는 Griess reagent (2% sulfanilamide in 5% phosphoric acid 5ml, 0.2% naphthyl ethylene diamine in 5% phosphoric acid 5ml)와 1:1로 반응하는 경우 chromophoric azo derivative를 형성하게 된다. SIN-1을 농도별로 (0, 10, 20, 30 mg/kg) 복강으로 투여하고 24시간 뒤 540-570nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 실험군에서 분리한 혈장에서 생성된 NO의 양을 비교한 결과 최대 2 배정도 NO의 양이 증가된 것을 확인 할 수 있었다 (data not shown). 한편 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질 50 mg/kg을 1, 2, 3 일 동안 처리한 결과 NO 생성은 약 50% 정도 억제되었다 (Fig 34).

라. ALT assay

ALT와 AST는 간세포가 손상을 받은 경우 혈액으로 배출되므로, 여러 가지 NO donor로 인한 간 손상을 측정하는 지표로 혈액 중 ALT와 AST 양을 측정하였다. SIN-1과 LPS를 농도별로 (0, 10, 30 mg/kg) i.p. 투여하고 24시간 뒤 각각의 실험군에서 분리한 혈장에서 ALT와 AST 수치를 측정한 결과 거의 변화가 없는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig 35). 즉 SIN-1과 LPS로 인하여 유도된 산화적 손상은 간독성에는 큰 영향이 없다고 할 수 있으며, 간에 존재하고 있는 다른 여러 가지 물질의 대사에 관여하는 효소들에 대한 영향을 살펴본다면, 간기능에 대한 효과를 측정할 수 있을 것이다.



SIN-1 (45 mg/kg)	-	+	+	+	+
Tuna (50 mg/kg)	-	-	+	+	+
Days of Treatment			1	2	3

Fig 34. The effect of nucleic acid complex from tuna spermary on plasma NO levels after SIN-1 administration

Plasma NO levels were measured 24 h after treatment with SIN-1 (45 mg/kg i.p.) in the precense or absense of nucleic acid complex from tuna spermary

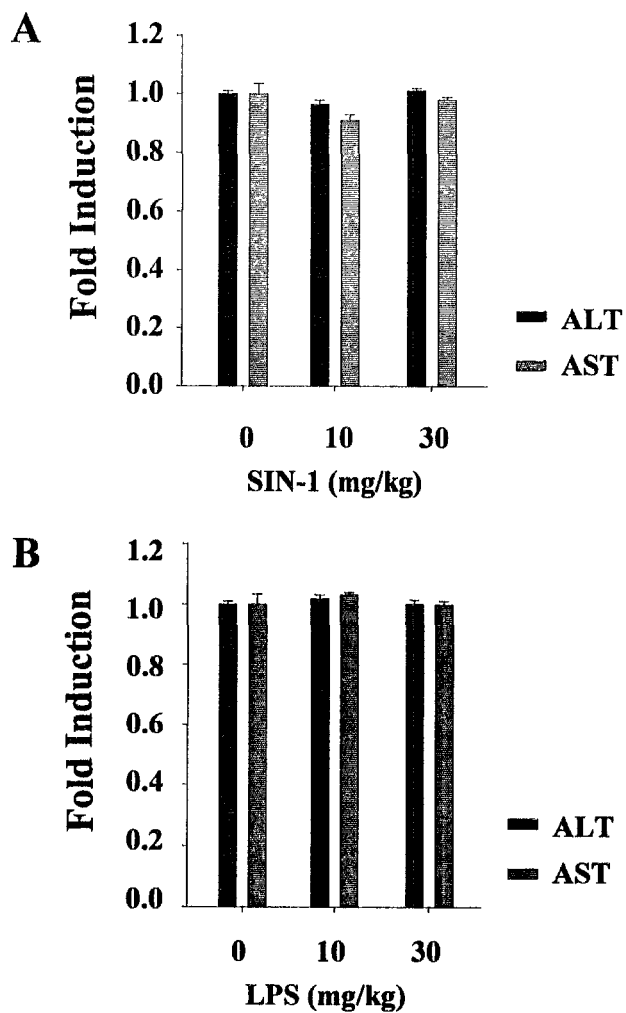


Fig 35. The effect of SIN-1 and LPS on plasma ALT and AST levels

Plasma ALT and AST levels were measured 24 h after treatment with various doses of SIN-1 (A) and LPS (B) (i.p.)

마. 조직내 GSH/GSSG level 측정

환원형 glutathione (GSH)는 간조직에서 mM 수준의 농도로 존재하고 있으며, 이는 강한 환원력을 가지고 있어 radical scavenger로 작용을 하며, 항산화 방어기작에서 중요한 역할을 한다. 또한 GSH는 여러 가지 효소의 보조인자로서의 역할을 하고 있으며, 외부 독성물질의 무독화 과정에서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. SIN-1과 LPS를 용량별로 (0, 10, 30 mg/kg) i.p. 투여하고 24시간 뒤 간과 뇌 조직에서 GSH 수치를 비교한 결과 용량 의존적으로 현저히 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 36). 한편 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질 50 mg/kg을 1, 2, 3 일 동안 처리한 결과 간 조직의 경우 GSH 수치에는 거의 변화가 없었으며, 뇌 조직의 경우 최대 18% 정도 증가되었다. 하지만 두 조직에서 모두 대조군 정도의 회복은 기대할 수 없었다 (Fig 37).

2. 지질의 과산화 반응에 대한 저해 효과

NO와 그 대사물은 여러 조직에 있어 지질의 과산화를 개시, 유도하는 것으로 알려져 왔으며, 이로 인한 반응 산물을 세포에 손상을 일으킨다. 지질 과산화 반응은 자유 라디칼들에 의해 지질 막의 불포화지방산들이 산화적 분해를 일으키는 것으로 malondialdehyde가 지질과산화의 대표적 지표로 이용되고 있다. SIN-1을 용량별로 (0, 10, 30 mg/kg) 복강으로 투여하고 24시간 뒤 간 조직에서 지질과산화 정도를 흡광도로 비교한 결과 SIN-1 용량 의존적으로 최대 1.5-1.6배의 증가를 보였다 (Fig 38A). LPS를 용량 별로 (0, 10, 30 mg/kg) 복강으로 투여하고 24시간 후 간과 뇌 조직에서 지질과산화 정도를 흡광도로 비교한 결과 각각 약 2배, 1.3배 정도 증가되었다 (Fig 38B). 한편 SIN-1 45 mg/kg을 복강으로 투여하고, 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질 50 mg/kg을 1, 2, 3일 경구 투여한 군과 투여하지 않은 군에서 지질과산화를 비교한 결과 간 조직의 경우 거의 보호효과를 관찰할 수 없었으며, 뇌 조직의 경우 현저한 보호효과를 관찰할 수 있었다 (Fig 39).

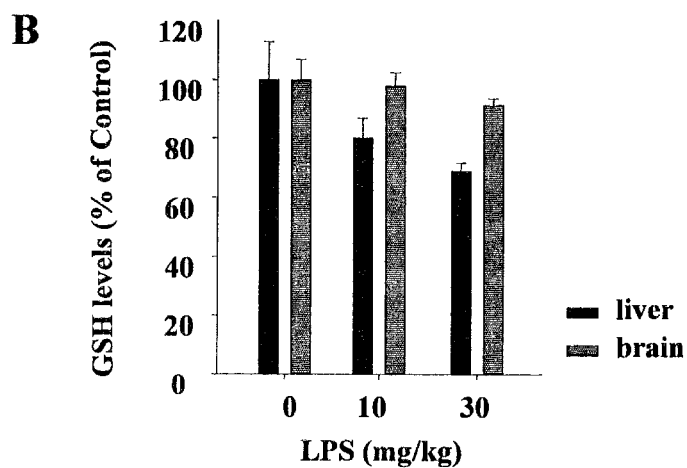
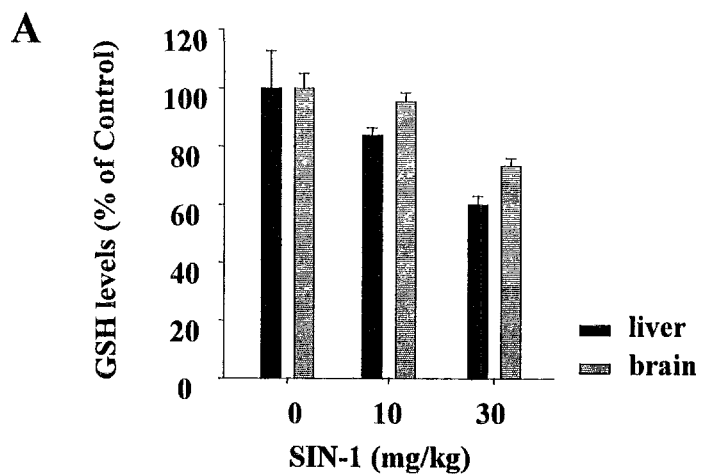


Fig 36. The effect of SIN-1 and LPS on intracellular GSH levels
 GSH levels in liver and brain homogenate were measured 24hr after treatment with various doses of SIN-1 (A) and LPS (B) (i.p.)

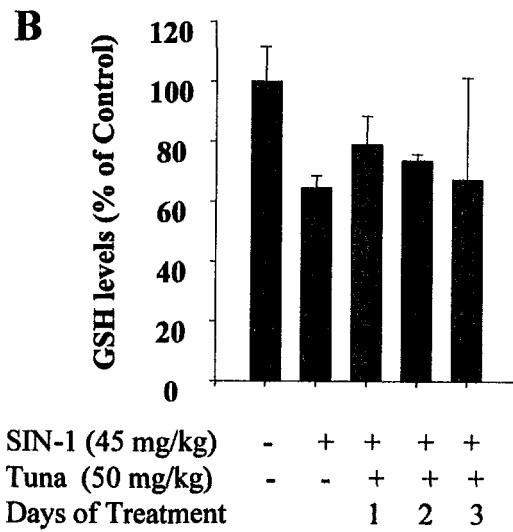
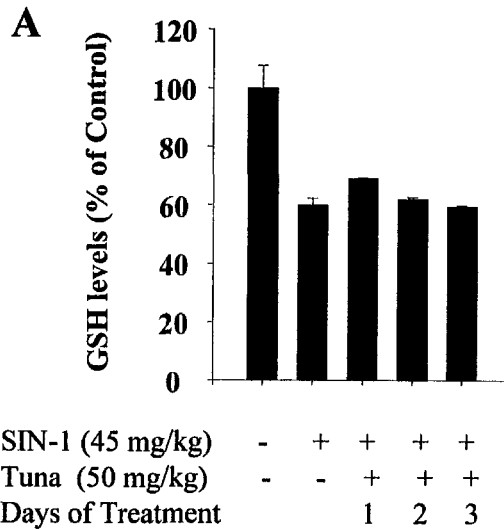


Fig 37. The effect of nucleic acid complex from tuna spermary on intracellular GSH levels after SIN-1 administration
 GSH levels in liver (A) and brain (B) homogenate were measured 24hr after treatment with SIN-1 (45 mg/kg i.p.) in the precense or absense of nucleic acid complex from tuna spermary

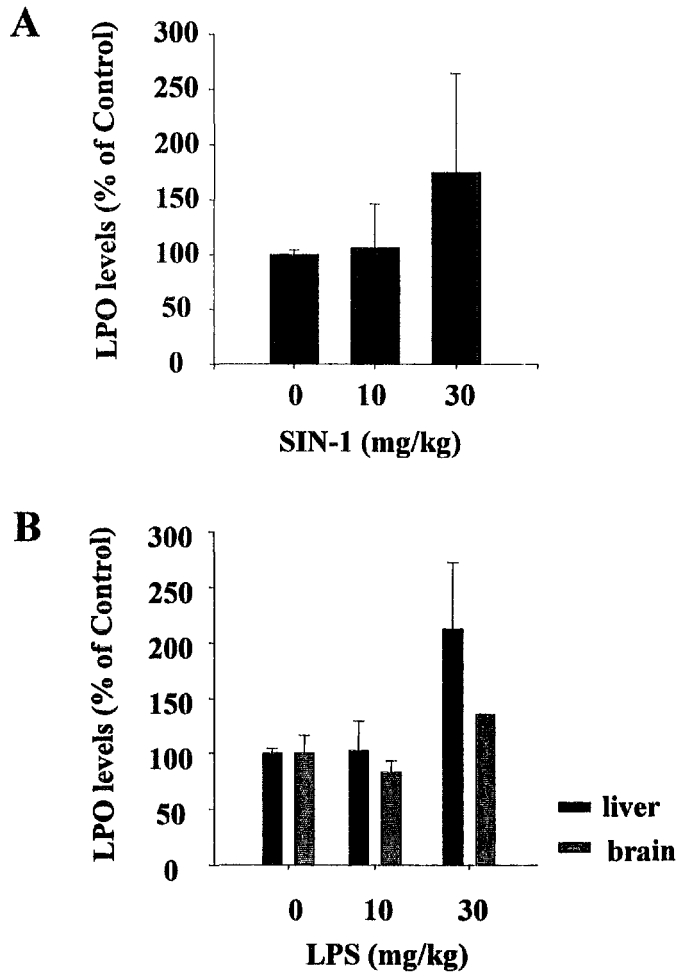
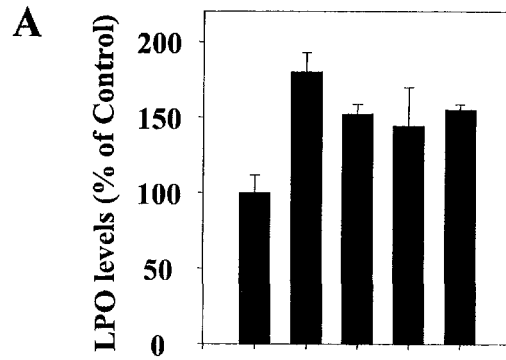
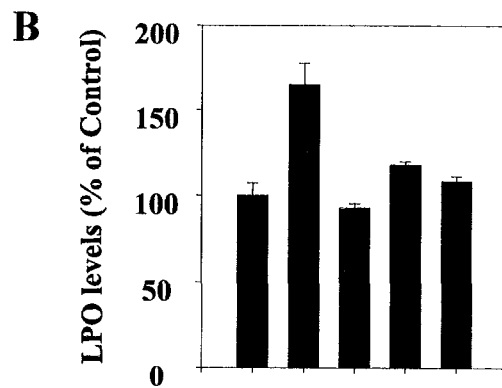


Fig 38. The effect of SIN-1 and LPS on lipid peroxidation

LPO levels in liver and brain homogenate were measured 24 h after treatment with various doses of SIN-1(A) and LPS(B)(i.p.)



SIN-1 (45 mg/kg)	-	+	+	+	+
Tuna (50 mg/kg)	-	-	+	+	+
Days of Treatment			1	2	3



SIN-1 (45 mg/kg)	-	+	+	+	+
Tuna (50 mg/kg)	-	-	+	+	+
Days of Treatment			1	2	3

Fig 39. The effect of nucleic acid complex from tuna spermary on lipid peroxidation after SIN-1 administration

LPO levels in liver (A) and brain (B) homogenate were measured 24hr after treatment with SIN-1 (45 mg/kg i.p.) in the presence or absense of nucleic acid complex from tuna spermary

3. Hydroxyl radical에 대한 포착효과

가. Deoxyribose assay

hydroxyl radical은 산화적 스트레스를 유발하는 물질에 의해 생성된 과산화 수소와 생체 내 전이 금속의 작용 (Fenton reaction), UV 조사등에 의해 생성 될 수 있는 활성 산소종으로, 여러 활성 산소종 중에서 가장 반응성이 크며, 단백질, 지질, DNA 등의 생체 내 거대 분자의 손상을 유발 할 수 있다. 본 실험에서는 hydroxyl radical에 의해 손상된 deoxyribose를 TBA 발색법을 이용하여 측정하였으며, 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합물질의 hydroxyl radical 포착 능력을 측정하였다. 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합물질은 농도 의존적으로, 최대 36%의 hydroxyl radical 포착능력을 보였다(Fig 40).

나. Trapping assay

hydroxyl radical에 대한 포착 능력을 더욱더 정확히 측정하기 위하여 trapping assay를 실시하였다. hydroxyl radical을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있지만 특히, aromatic hydroxylation (trapping assay)을 이용한 방법이 가장 명확한 방법으로 알려져 있다. 방향족 화합물은 hydroxyl radical과 반응하여 첨가 반응을 일으키는데, 본 실험에서는 salicylic acid를 이용하여 hydroxyl radical을 포집하였고, 이로 인해 생성된 2,5-DHBA와 2,3-DHBA를 액체크로마토그래피를 이용하여 정량 하였다. 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질은 농도 의존적으로 (0, 0.5, 1, 2.5, 5mg/ml) aromatic hydroxylation 반응 산물의 형성을 억제하였다(Fig 41). 이상의 deoxyribose assay와 trapping assay에서 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질은 특히 활성 산소종 중 hydroxyl radical을 포착하는 능력이 있음을 알 수 있었다.

다. Hydroxyl radical로 유도한 DNA 손상과 이에 대한 보호효과

hydroxyl radical은 여러 생체 물질과 다양한 반응을 할 수 있는데 특히 DNA 가닥 절단과 DNA 염기의 변형 그리고 세포의 성장, 분열, 분화 등을 조절하는 유전자에 대한 영향을 들 수 있다.

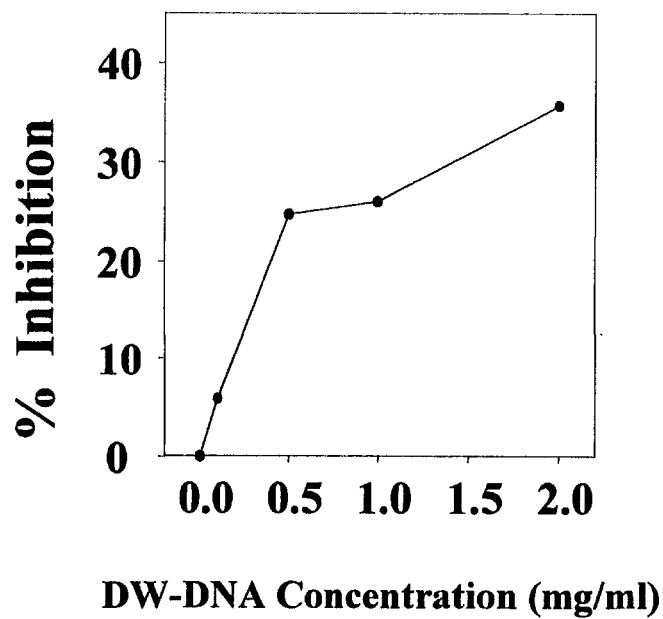


Fig 40. Hydroxyl radical scavenging effect of nucleic acid complex from tuna sperm (Deoxyribose assay)

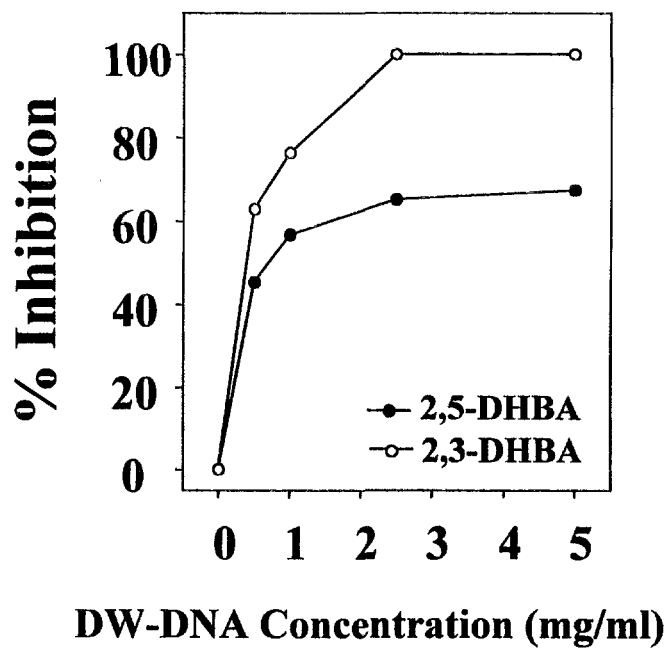


Fig 41. Hydroxyl radical scavenging effect of nucleic acid complex from tuna sperm (Trapping assay)

본 실험에서는 과산화수소와 2가의 철, 자외선을 이용하여 hydroxyl radical을 생성시켜 ϕ X174 DNA 손상을 유도하고 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합물질과 대조군으로 일본 연어 백자 추출물을 처리하여 보호 효과를 측정하였다. super coiled 형태의 DNA는 과산화 수소와 2가 철에 의해 손상을 받아 open circular 형태의 DNA로 되었으며, 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합물질을 1, 5, 10 mg/ml의 농도별로 처리함으로써 이러한 open circular DNA의 양은 감소되었다(Fig 42 : lane 1,6,7, 8,9). 그러나, 원래의 super coiled 형태의 DNA는 관찰 할 수 없었다. 과산화 수소만으로는 DNA에 손상을 일으키지 않았으며, 즉 전이금속인 2가 철과의 Fenton reaction을 통하여 발생된 hydroxyl radical이 DNA 손상을 일으킨 것을 확인 할 수 있었으며(Fig 42 : lane 5,6), 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합물질 자체는 ϕ X174 DNA band에 영향을 주지 않았다(Fig 42 : lane 1,2,3,4). 한편 UV 조사를 한 경우 DNA는 손상을 받아 open circular 형태가 되었으며 이는 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질, 일본 연어 백자 추출물을 처리한 경우에서 농도 의존적으로 open circular DNA 양이 감소하였고, super coiled DNA 양이 증가하였다(Fig 43).

이상의 결과들로 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질은 활성 산소종 중 가장 큰 반응성을 가지는 hydroxyl radical에 대해 포착 효과가 있으며, DNA 손상에 대한 보호효과를 가지는 것을 알 수 있었다.

4. NO donor로 유도한 DNA 손상 억제 효과

NO는 여러 가지 생체 물질들과 다양한 반응을 할 수 있으며, 특히 DNA 가닥 절단과 염기의 변형 그리고 세포의 성장, 분열, 분화 등을 조절하는 유전자에 대한 영향이 중요한 부분을 차지하고 있다. 본 실험에서는 여러 가지 NO donor를 사용하여 ϕ X174 DNA에 손상을 유도하고 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질을 처리하여 보호 효과를 측정하였다. SNP를 농도별로 (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 mM), 37°C에서 1 시간 처리한 경우 DNA는 손상을 받아 전체적인 양이 감소하는 경향을 보였다(Fig 44A). 이는 손상을 받을수록 super coiled 형태에서 open circular, linear 형태로 전환하는 전형적인 활성산소종에 의한 DNA 가닥 절단과는 다른 양상을 나타낸 것이다. 여기에 핵산복합물질을 농도별로 처리한 경우 DNA는 아무 것도 처리하지 않은 대조군의 형태로 회복되었다 (Fig 44B).

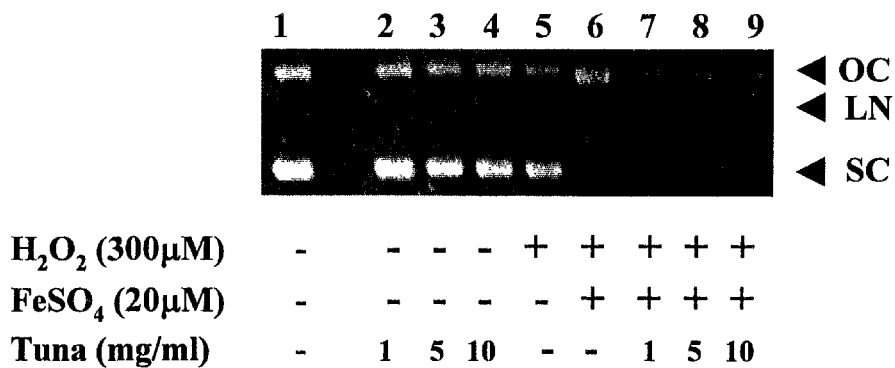


Fig 42. Protective effect of nucleic acid complex from tuna spermary against X174 DNA scission induced by hydrogen peroxide and ferrous ion
 OC, open circular form X174 DNA ; LN, linear form ;
 SC, supercoiled form

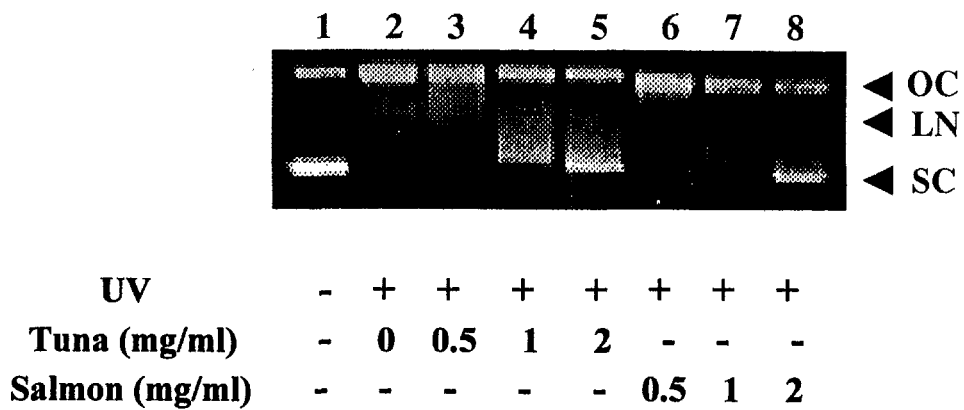
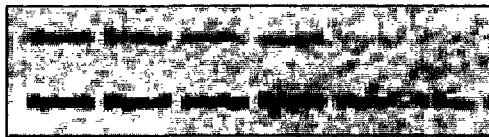


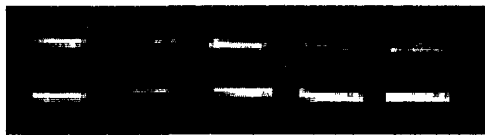
Fig 43. Protective effect of nucleic acid complex from tuna spermary and extract from Japanese salmon against X174 DNA strand scission induced by UV irradiation
 OC, open circula form X174 DNA : LN, linear form : SC, supercoiled form

A



SNP (mM) 0 0.25 0.5 1 2 3

B



SNP (3 mM) - + + + +
Tuna (mg/ml) - 0 0.5 1 2

Fig 44. Protective effect of nucleic acid complex from tuna sperm against fx174 DNA strand scission induced by SNP

5. Superoxide anion에 대한 포착 효과

superoxide anion은 여러 생체 활동으로 인하여 생성되는 활성 산소종으로, 세포막을 투과할 수 있을 정도로 안정하며, 생체내 거대 분자들과 반응하여 독성을 나타낸다. 조건에 따라서 더 반응성이 큰 hydroxyl radical을 형성 할 수도 있다. 따라서 superoxide anion은 생성 된 후 많은 거리를 이동하여 생체내 거대 분자들과 반응 할 수 있다. 본 실험에서는 xanthine oxidase에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원법을 이용하여 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질과 대조군으로 일본 연어 백자 추출물의 superoxide anion 포착 능력을 알아보았다. 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질 (0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 일본 연어 백자 추출물(0, 0.25, 0.5, 1mg/ml)을 처리한 경우 모두 농도 의존적으로 superoxide anion을 포착하는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig 45). 이로써 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질이 superoxide anion 생성에 있어서도 좋은 포착제임을 알 수 있었다.

6. Bacteria를 이용한 항돌연변이 효과

본 실험에서는 산화적 자극에 민감하게 반응하는 *Salmonella typhimurium* TA102 균주를 사용하여 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질의 항돌연변이 효과를 알아보았다. 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질 자체 또는 대조군으로 사용한 일본 연어 백자 추출물 자체로는 실험 균주에 돌연변이를 유도하지 않았고, *tert*-butylhydroperoxide (100 $\mu\text{g}/\text{plate}$)의 첨가로 유전 독성이 유도되었다. 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질의 경우 농도 의존적으로 (0, 0.1, 1, 10, 20 mg/plate) *tert*-butylhydroperoxide로 유도한 돌연변이를 최대 24% 억제하였으며, 일본 연어 백자 추출물의 경우 역시 농도 의존적으로 (0, 0.1, 1, 10, 20 mg/plate) 최대 72% 항돌연변이 효과를 나타내었다(Fig 46).

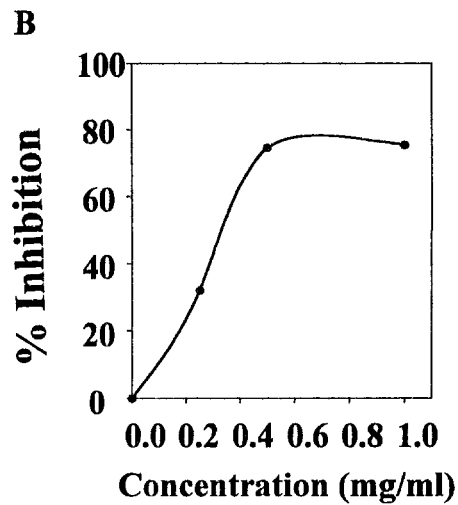
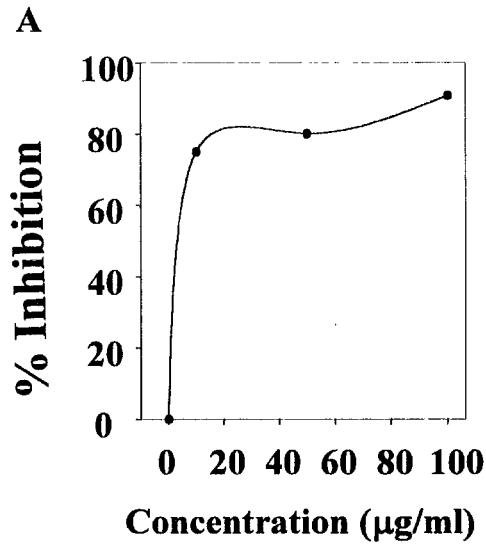


Fig 45. Superoxide scavenging effect of nucleic acid from tuna spermary(A) and extract from Japanese salmon(B) (NBT reduction method)

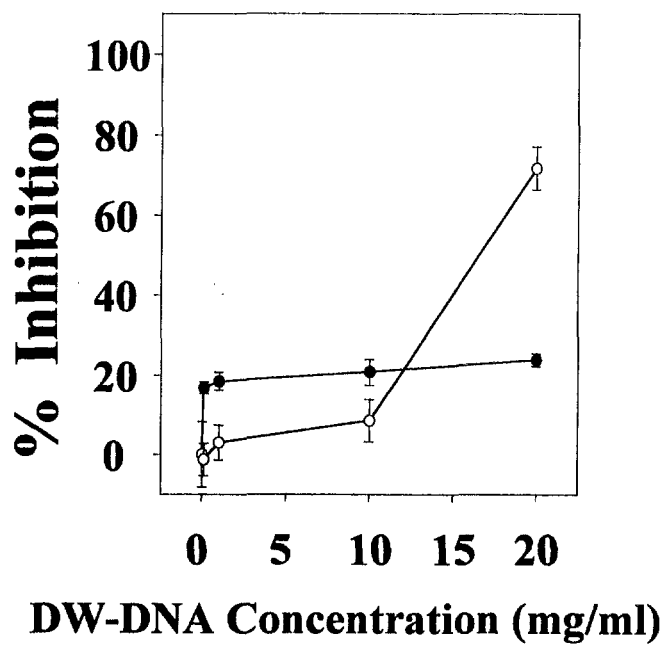


Fig 46. Effect of nucleic acid complex from tuna sperm (●) and extract from Japanese salmon (○) on tert-butyl-hydroperoxide- induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA102

7. 분화된 HL-60 세포에서의 Superoxide anion 생성 저해 효과

HL-60 세포는 인체 혈액암 세포로 acute promyelocytic leukemia 환자의 peripheral blood leukocyte로부터 분리된 세포들을 배양시켜 얻어진 세포주이다. 특히, 분화된 HL-60 세포는 중앙 촉진제인 TPA에 의해 superoxide anion을 생성하며 이는 Cytochrome C를 가해 줌으로써 검출 할 수 있다. 우선 분화된 HL-60 세포에서 TPA에 의해 superoxide anion 형성되는 조건을 설정하였고, 분화되지 않은 세포와 Cytochrome C 만을 가한 경우 superoxide anion의 형성이 거의 control과 동일한 것을 확인하였다 (Fig 47). 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질은 농도의존적으로 (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml) DMSO로 분화된 HL-60 세포의 superoxide anion의 생성을 저해하였다 (Fig 48).

8. Oxidative stress에 의한 세포사멸 유도 및 보호효과

과산화 수소는 가장 대표적인 활성 산소종으로 여러 가지 질병을 일으키는 원인으로 추정되고 있으며, 최근 생체내 신호전달 매개물질로도 많은 주목을 받고 있다. 과산화 산소는 생체내의 전이 금속과 반응하여 더욱 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하여 생체내 중요한 역할을 하는 유전자, 단백질, 지질 등의 거대 분자에 독성을 나타낸다. 본 실험에서는 PC12 세포에 과산화 수소를 농도별로 처리하여 산화적 세포 사멸을 유도하고, 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질 또는 일본 연어백자추출물을 처리하여 세포 독성에 미치는 효과를 MTT assay로 정량적으로 측정하였다. 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질(50 μ g/ml) 또는 일본 연어백자추출물(50 μ g/ml)을 과산화수소 농도별로 (0.25, 0.35, 0.45mM) 동시에 60분간 처리하고 세포 독성을 측정한 결과 뚜렷한 보호 효과를 관찰할 수 없었으며(Fig 49), 참치 정소로부터 추출한 핵산 복합 물질의 농도를 변화시키며 측정한 결과 역시 보호 효과를 관찰 할 수 없었다(data not shown). 한편, 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질의 preincubation time을 변화시키며(0, 0.5, 3, 7, 9 시간) 보호 효과를 관찰한 결과 7시간 preincubation 한 경우 약간의 보호 효과를 관찰 할 수 있었다(Fig 50). 이는 참치 정소로부터 분리한 핵산복합물질이 단일 성분이 아니므로 세포 배양시 다른 물질의 작용을 배제할 수 없다고 하겠다.

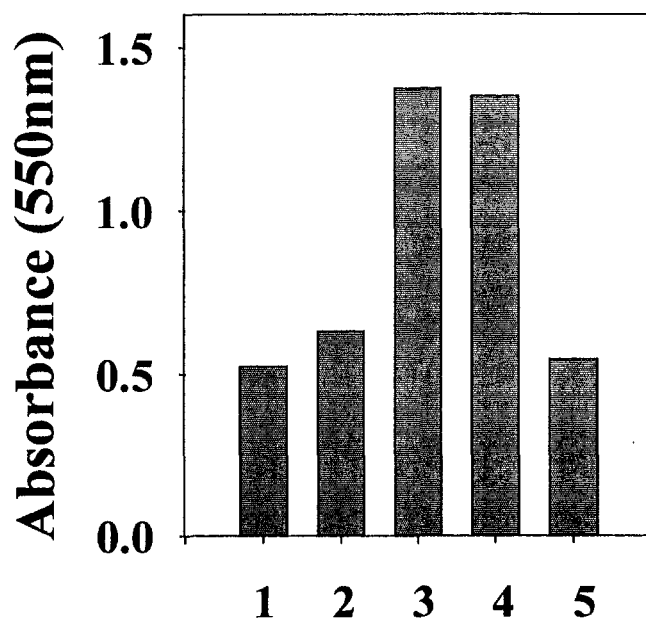


Fig 47. Measurement of superoxide anion in HL-60

(Cytochrome C reduction method)

1 No Cell

2 Undifferentiated Cell

3 Differentiated Cell + Cytochrome C + TPA 60 mM

4 Differentiated Cell + Cytochrome C + TPA 120 mM

5 Differentiated Cell + Cytochrome C

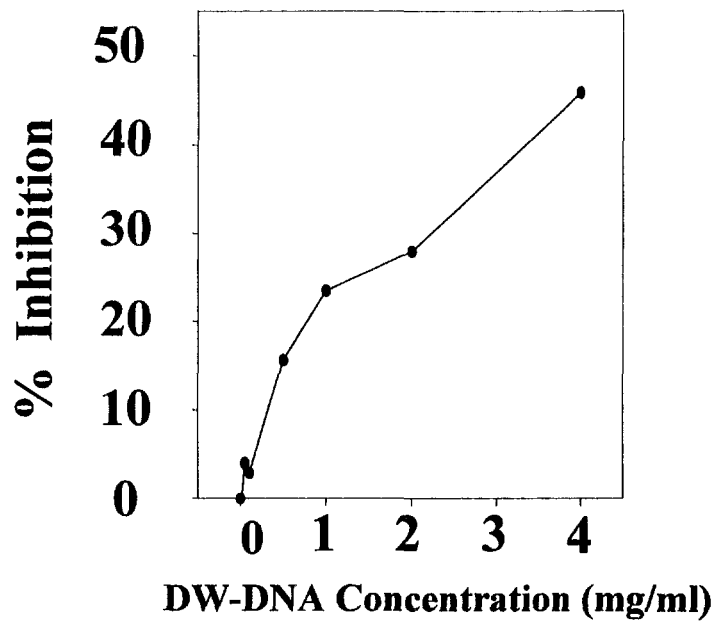


Fig 48. Inhibition of TPA-induced superoxide anion generation by nucleic acid complex from tuna spermary in differentiated HL-60 cells (Cytchrome C reduction method)

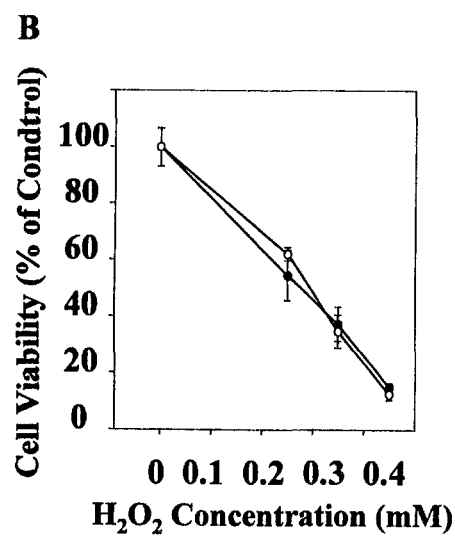
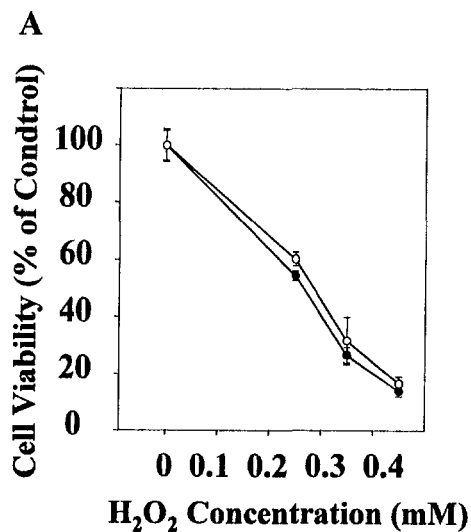


Fig 49. Effect of nucleic acid complex from tuna sperm and extract from salmon on H₂O₂-induced cytotoxicity
 PC12 cells were incubated with indicated concentrations of H₂O₂ in the absence (●) or presence (○) of 50mg/ml nucleic acid complex from tuna sperm (A) and extract from Japanese (B) salmon for 1hr at 37°C

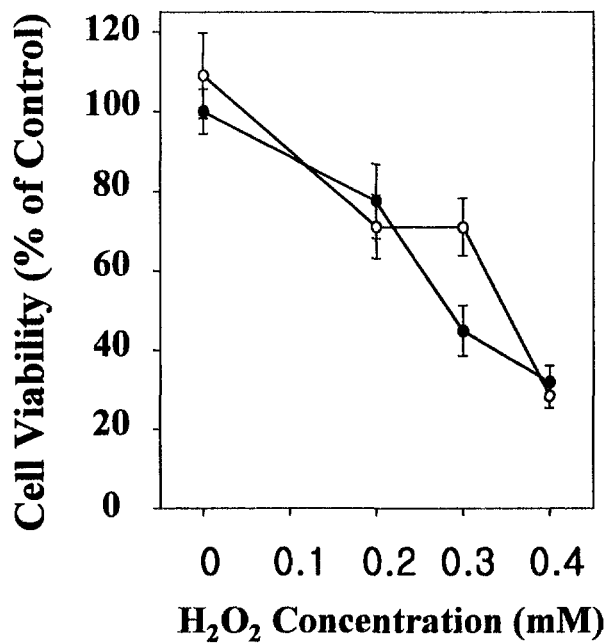


Fig 50. Protective effect of nucleic acid complex from tuna spermery on H2O2-induced cytotoxicity

PC12 cells were incubated with indicated concentrations of H2O2 in the in the absence (●) or presence (○) of 50mg/ml nucleic acid complex from tuna spermery for 1hr at 37°C

9. 염증반응 억제 효과

NO 및 그 대사물은 proinflammatory prostaglandin (PG) 생성 및 COX-2 발현의 조절을 매개함으로써 염증반응에 중요하게 작용한다. PG는 arachidonic acid가 두 단계를 거쳐 prostaglandin synthase의 작용에 의해 생성된다. 첫 번째는 COX에 의해 arachidonic acid가 cyclic endoperoxidase (PGG₂)가 생성된다. 이렇게 만들어진 unstable intermediate product는 specific isomerase enzymes에 의해 빠르게 여러 prostaglandins (PGE₂, PGF₂, TXA₂, PGI₂)으로 변화된다. COX는 constitutive isoform인 COX-1과 inducible isoform인 COX-2의 2가지 형태가 존재하지만 주로 inflammation process에서는 COX-2가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 염증이 일어난 곳에 proinflammatory PGs가 과량 방출된다. SIN-1 45 mg/kg을 복강으로 투여하고 24시간 뒤 혈장내의 PGE₂ level을 측정된 결과 5.2 배정도 증가된 것을 관찰 할 수 있었으며, 참치 정소로부터 추출한 핵산복합물질 50 mg/kg을 1, 2, 3 일 동안 처리한 결과 PGE₂ level은 거의 대조군의 수치 정도로 억제되었다 (Fig 51).

10. 세포 배양을 이용한 산화적 세포사멸 보호효과 및 분자생물학적 작용기전 규명

가. 세포 독성에 대한 보호효과

세포 배양을 이용한 산화적 세포사멸 보호효과를 살펴보기 위하여 본 실험에서는 PC12 세포에 SNP를 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질을 함께 처리하여 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 하지만 핵산복합물질의 농도 (5, 20, 50 µg/ml)와 전처리 시간 (1, 3, 6 시간)을 변화시키며 SNP를 농도별로 (0, 0.5, 1, 2.5 mM)을 6시간 처리하고 측정된 결과 보호효과를 관찰 할 수 없었다 (Fig 52A). 한편, SNP의 농도를 낮추어 (0, 0.1, 0.25, 0.5 mM) 장시간 (24시간) 처리한 경우 약간의 보호효과를 관찰 할 수 있었지만 (Fig 52B), 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질을 장시간 세포배양 하는 경우 자체가 멸균된 상태이거나 여과 가능하지 않아

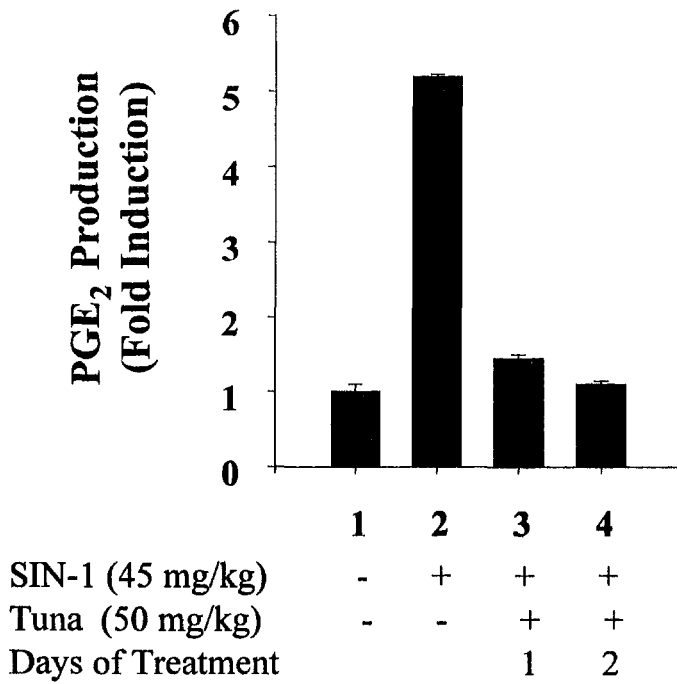


Fig 51. The effect of nucleic acid complex from tuna spermary on plasma PGE2 levels after SIN-1 administration

Plasma PGE2 levels were measured 24 h after treatment with SIN-1 (45 mg/kg i.p.) in the precense or absense of nucleic acid complex from tuna spermary

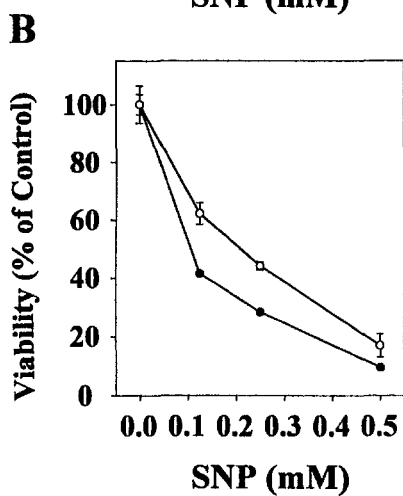
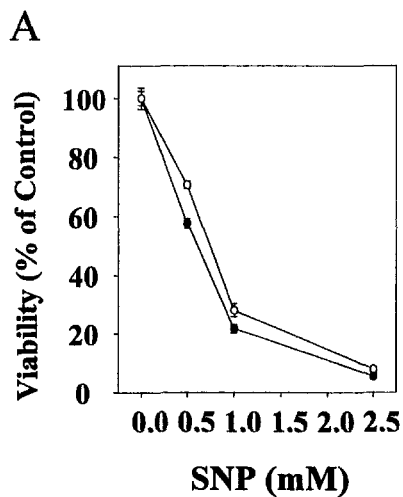


Fig 52. Effect of nucleic acid complex from tuna spermary on SNP-induced cytotoxicity

PC12 cellswere incubated with indicated concentrations of SNP in the absence (●) of presence (○) of 5mg/ml nucleic acid complex from tuna spermary

더 이상의 실험을 진행 할 수 없었다.

나. apoptosis 유도에 대한 억제 효과

세포사멸의 한 형태인 apoptosis를 측정하는 대표적인 지표중의 하나로 DNA fragmentation을 전기영동으로 살펴보았다. 하지만, 1mM의 SNP를 8시간 처리한 경우 DNA laddering 현상이 보이지 않았으며, 오히려 smear 된 현상이 관찰되었다. 즉 DNA가 고농도의 NO에 의해 단시간 손상을 받아 오히려 necrosis로 진행한 것으로 보인다. 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질을 동시에 처리한 경우 뚜렷한 보호효과는 볼 수 없었다(Fig 53).

다. PARP / Caspase-3 억제 효과 검토

apoptosis가 진행이 되는 경우 다양한 유전자들이 순차적으로 활성화되는데, 그 중 대표적인 것이 PARP cleavage를 통한 effector caspase들의 활성화이다. 1, 2.5 mM의 SNP를 8시간 처리한 경우 PARP cleavage는 관찰되지 않았으며, 참치정소로부터 추출한 핵산복합물질 5 μ g/ml 을 처리한 경우 역시 뚜렷한 보호효과는 관찰 할 수 없었다 (Fig 54).

M 1 2 3

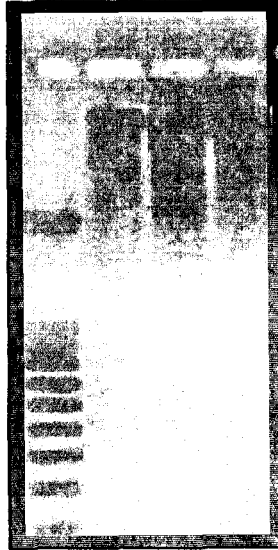


Fig 53. Effect of nucleic acid complex from tuna spermary on SNP-induced DNA fragmentation

DNA extracts from PC12 cells following SNP treatment with or without nucleic acid complex from tuna spermary were subjected to 1.8% agarose gel electrophoresis. M, 1kb DNA ladder marker; lane 1, no treatment; lane 2, SNP 1 mM alone; lane 3, SNP 1 mM + nucleic acid complex from tuna spermary 5 mg/ml



Fig 54. Effect of nucleic acid complex from tuna spermary on SNP induced PARP cleavage

Protein extracts from PC12 cells following SNP treatment with or without nucleic acid complex from tuna spermary were analyzed by western blotting. Lane 1, no treatment; lane 2, SNP 1mM alone; lane 3, SNP 1mM + nucleic acid complex from tuna spermary 5mg/ml; lane 4, SNP 2.5mM; lane5, SNP 2.5mM + nucleic acid complex from tuna spermary 5mg/ml

여 백

제 4 장 고 찰

섭취된 핵산복합물질이 생체 면역 기능을 증강시키거나 억제된 면역 기능을 정상으로 회복시켜줌으로써 효과를 발휘하고, 활성산소에 의한 지질과산화에 있어서의 억제작용 및 혈청 HDL- cholesterol의 함량을 높이는 등의 지질대사 개선작용과 비피더스균과 호기성균을 증가시켜 장내 균총의 개선작용 등의 생리활성을 갖는다는 것은 서론에서 언급한 바 있다. 이렇듯 점차 식이핵산에 대한 연구가 활발해지고 있고 산업적으로 그 이용성이 증가하고 있지만 대부분 원료물질로서 연어, 청어 등을 이용하고 있고 아직까지 참치를 원료물질로서 연구한 결과는 발표되고 있지 않다.

본 연구에서는 상기의 연구를 바탕으로 참치정소로부터 핵산복합물질 및 핵산물질을 분리하는 기술을 개발하였다. 일반적으로 핵산성분을 추출하는데 있어서는 추출뿐만 아니라 정제를 위해서 다량의 ethanol을 사용하는데 이 경우 이용되는 ethanol의 양이 과다하여 상당량의 폐액이 발생하고, ethanol을 재사용하기 위하여 보통 회수장치를 갖춰야만 하는데 이는 추출물의 경제성을 현저히 저하시키는 원인이 된다. 따라서 본 공정에서는 한외여과장치를 이용하여 발생하는 폐액을 최대한 감소시키고 ethanol등 유기용매의 사용을 억제함으로써 위험요소를 제거하였는바 참치정소로부터 한외여과법을 이용하여 핵산복합물질(DW-DNA)을 추출하는 데에는 문제가 없었다. 수율은 약 2.0% 정도 (참치정소 수분함량 80.4%, dry base로 환산) 이었고 핵산함량은 약 82.4% 정도로 높게 나타났으며, 한외여과막의 크기를 달리하여 추출한 경우 MWCO 10,000을 이용할 때가 수율 및 추출물의 핵산함량 측면에서도 가장 이상적으로 나타났다. 핵산물질에 대한 추출에서는 핵산성분이 산성 조건하에서 다른 성분들과 분리되어 침전되는 현상이 있음을 이용하여 산처리를 통한 핵산물질을 추출하는 공정을 수립하였고, 이렇게 얻은 핵산물질은 약 2.2% 정도의 수율과 89% 이상의 핵산함량을 나타내었다.

또한 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질인 DW-DNA를 섭취 시료로 하여 in vivo 및 in vitro에서 생리활성을 연구한 바, 암으로 인하여 저하된 숙주의 면역기능을 정상으로 회복시키거나 증강시켜 생체 반응 조절 물질로서의 작용을 나타내는 면역 활성능이 있음을 확인하였고, 경구투여 혹은 복강투여 하였을 경우 모델항원

에 의해 유도되는 Th1 면역반응을 효과적으로 유도하여 병원체에 대한 저항성을 높여줄 수 있다는 것을 알 수 있었다. 중량부하 동물의 유영시간 측정 및 영양결핍 동물의 지구력 증가여부 실험을 통하여 항피로 효과가 있음을 확인하였고, 기억능력 실험을 T-미로장치에서 출발지점에서 목적지점까지의 유영시간을 측정함으로써 실시한 결과 출발지점에서 목적지점까지의 유영시간이 100, 150, 200mg/kg 투여군에서 모두 유의적으로 단축된 것을 확인할 수 있었다.

활성산소종이 과도하게 생성되거나 이를 제거하는 항산화 방어 기작에 손상이 일어난 경우 유발되는 산화적 스트레스는 다양한 질병의 원인이 된다고 알려져 있는데, 활성산소종은 산소에서 유래한 산소보다 산화력이 더 큰 분자로 주로 hydrogen peroxide, superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, peroxy radical 등을 말한다. 본 연구에서는 활성산소종에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 대한 핵산복합물질의 항산화 보호효과를 여러 가지 생화학적, 조직 병리학적 지표들을 이용하여 다각적으로 검색하고 그 분자생물학적 작용기전을 규명하였는 바 참치정소로부터 분리한 핵산복합물질이 혈장 내에서 NO의 생성, 지질과산화, 세포 내 GSH양의 감소를 억제하여 생체내 산화적 손상에 대해 보호효과를 가짐을 확인하였고, 농도 의존적으로 hydroxyl radical, superoxide anion을 포착하였으며, hydroxyl radical에 의한 DNA 손상도 억제하였고, 산화적 스트레스 유발물질인 tert-butylhydroperoxide로 유도한 TA102 균주의 mutagenesis를 억제하여 항돌연변이 효과를 나타내었을 뿐만 아니라 분화된 HL-60 세포에서의 superoxide anion 생성저해, 과산화수소로 유도된 PC12 세포의 산화적 사멸에 대한 보호효과를 나타내어 항산화 기능을 가짐을 확인하였다.

따라서, 본 연구를 통하여 위와 같은 생리활성을 갖는 식품의 기능성 원료로 충분히 이용할 수 있음을 확인하였고, 아직까지 부산물로 폐기되는 어류 정소의 고부가가치화뿐만 아니라 새로운 생리활성 소재로서 이용하는 데에도 매우 유용할 것으로 기대되었다.

참 고 문 헌

1. Prentice-Hall International Inc. : Harper's Biochemistry, 23th ed.,
Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. USA(1990)
2. Large Medical Publications : Harper's Review of Biochemistry, Martin,
D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. and Granner, D.K., California, USA(1985)
3. 松永政司. 核酸の生理活性作用. *Fragrance J.* 5 : 107-112 (1995)
4. Adjei, A.A., Yamamoto, S. and Kulkarni, A. Nucleic acid and/or their
components - A possible role in immune function. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*
41 : 1-16 (1995)
5. Leleico, N.S., Walsh, M.J. and Abraham, S. Gene expression in the
intestine - The effect of dietary nucleotides. *Advances in Pediatrics.*
42 : 145-169 (1995)
6. 松永政司. 核酸の生理活性とその利用. *食品と開発.* 29 : 15-17 (1994)
7. Van Buren, C.T., Kulkarni A.D., Schandle, V.B. and Rudolph, F.B. The
influence of dietary nucleotides on cell-mediated immunity.
Transplantation. 36 : 350-352 (1983)
8. Kulkarni, A.D., Fanslow, W.C., Rudolph, F.B. and Van Buren C.T. Effect of
dietary nucleotides on response to bacterial infections. *JPEN.* 10 :
169-171 (1986)

9. Klubus, P. and Jones, B.L. Enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil by uridine rescue. *Pharmac. Ther.* 41 : 289-302 (1989)
10. Uauy, R., Quan, R. and Gil, A. Role of nucleotides in intestinal development and repair-Implications for infant nutrition. *J. Nutr.* 124 : 1436S-1441S, Review (1994)
11. Kulkarni, A.D., Rudolph, F.B. and Van Buren, C.T. The role of dietary sources of nucleotides in immune function. *J. Nutr.* 124 : 1442S-1446S, Review (1994)
12. Pizzini, R.P., Kumar, S., Kulkarni, A.D., Rudolph, F.B. and Van Buren, C.T. Dietary nucleotides reverse malnutrition and starvation-induced immunosuppression. *Arch. Surg.* 125 : 86-90 (1990)
13. Matsushita, S., Ibuki, F. and Aoki, A. Chemical reactivity of the nucleic acid bases. I. Antioxidative ability of the nucleic acids and their related substances on the oxidation of unsaturated fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 102 : 446-451 (1963)
14. Sato, N., Murakami, Y., Nakano, T., Sugawara, M., Kawakami, H., Idota, T. and Nakajima I. Effects of dietary nucleotides on lipid metabolism and learning ability of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 : 1267-1271 (1995)
15. Gil, A., Corral, E., Martinez, A. and Molina, J.A. Effects of the addition of nucleotides to an adapted milk formula on the microbial pattern of faces in at term newborn infants. *J. Clin. Nutr. Gastroenterol.* 1 : 127-132 (1986)

16. Uauy, R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J. Nutr.* 124 : 157S-159S, Review. (1994)
17. Protein-Calorie Advisory Group of United Nations : Clinical evaluation and acceptable nucleic acid levels of single cell protein for human consumption. *PAG Bull.* 5 : 17-26 (1975)
18. Kano, S. Dietary therapy of gout, in *Internal Medicine, Gout*, Kanehara Publishing Co., Tokyo, Mook Series 21 : 152-159 (1983)
19. Burton, K. A study of conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 315-323 (1965)
20. Yukiko, Y., Maeda, Y.Y. and Chihara, G. Periodical consideration on the establishment of antitumor action in host and activation of peritoneal exudate cells by letinan. *Gann.* 64 : 351-357 (1973)
21. Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37 : 410-413 (1989)
22. Dunham, N.W. and Miya, T.S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* 46 : 208-209 (1957)
23. Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffi blomhoffi* Boie. V. Anti-fatigue effect of the 50% ethanol extract in acute weight-loaded forced swimming-treated rats.

Biol. Pharm. Bull. 19 : 62-66 (1996)

24. 菊池英夫. 蛋白素材としての核蛋白. *New Food Industry*. 29 : 8-10 (1987)
25. Mowat A.M., 1987, The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol Today* 8 : 93
26. Garapin A, Ma L, Pescher P, Lagranderie M, Marchal G. Mixed immune response induced in rodents by two naked DNA genes coding for mycobacterial glycosylated proteins. *Vaccine*. 19(20-22) : 2830-41
27. Kim SK, Ragupathi G, Cappello S, Kagan E, Livingston PO. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*. 19(4-5) : 530-7 (2000)
28. Krieger JI, Chesnut RW, Grey HM. Capacity of B cells to function as stimulators of a primary mixed leukocyte reaction. *J Immunol*. 37(10) : 3117-23 (1986)
29. Arthur M. Krieg et al., CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature*. 374 : 546 (1995)
30. G. Hartmann, G. J. Weiner, and A. M. Krieg., CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *PNAS*. 96 : 9305 (1999)
31. M. J. McCluskie, H. L. Davis., CpG DNA as mucosal adjuvant. *Vaccine* 18 : 231 (2000)

32. D. M. Klinman, K. M. Barnhart, J. Conover., CpG motifs as immune adjuvant. *Vaccine* 17 : 19 (1999)
33. J. N. Kline et al., Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxy-nucleotides in a murine model of asthma. *Journal of Immunol.* 160 : 2555 (1998)
34. Chang, R.C., Hudson, P., Wilson, B., Haddon, L., Hong, J.S., Influence of neurons on lipopolysaccharide-stimulated production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by cultured glia. *Brain Res.* 853 : 236-244 (2000)
35. Rocha, I.M., Guillo, L.A., Lipopolysaccharide and cytokines induce nitric oxide synthase and produce nitric oxide in cultured normal human melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 293 : 245-248 (2001)
36. Goodwin, D.C., Landino, L.M., Marnett, L.J., Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* 10 : 1121-1136 (1999)
37. Chung, H.T, Pae, H.O, Choi, B.M, Billiar, T.R, Kim, Y.M., Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 : 1075 - 1079 (2001)
38. Kim, Y.M., Lee, B.S., Yi, K.Y., Paik, S.G., Upstream NF-kappaB site is required for the maximal expression of mouse inducible nitric oxide synthase gene in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236 : 655-660 (1997)

39. Zhang, C., Walker, LM., Hinson, J.A., Mayeux, P.R., Oxidant stress in rat liver after lipopolysaccharide administration: effect of inducible nitric-oxide synthase inhibition, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 : 968-972 (2000)
40. Chen, Y., Yang, L., Lee, T.J., Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation, *Biochem. Pharmacol.* 59 : 1445-1457 (2000)
41. Park, C.S., Baek, H.M., Chung, W.G., Lee, K.H., Ryu, S.D., Cha, Y.N., Suppression of flavin-containing monooxygenase by overproduced nitric oxide in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 56 : 507-514 (1999)
42. Raghavendra, V., Agrewala, J.N., Kulkarni, S.K., Role of centrally administered melatonin and inhibitors of COX and NOS in LPS-induced hyperthermia and adipisia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 60 : 249-53 (1999)
43. Halliwell, B. and Aruoma, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letters* 213 : 9-14 (1991)

최 중
연구보고서

**참치정소로부터 핵산복합물질의 개발 및
제품화연구**

**Development and Manufacturing of Nucleic acid
complex from Tuna Spermmary**

2001. 12

(주)동원 F&B 식품연구소

해 양 수 산 부