

발간등록번호

11-1541000-001046-01

돼지 정소 추출 스테로이드를 이용한
인체 질병 치료 및 남성 성기능 개선제 개발
Development of Pharmaceutical Steroid-Extract
from the Pig Testis for Human Disease Treatment
and Male Sexual Function Regulation

- 돼지 정소 추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술개발
- 돼지 정소 추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구
- 돼지 정소 추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향연구
- 돼지 정소 추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구

영남대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지 정소-추출 스테로이드를 이용한 인체 질병 치료 및 남성 성기능 개선제 개발” 과제(세부과제 “돼지 정소 추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 7 월 11 일

주관연구기관명 : 영남대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 최 인 호

세부연구책임자 : 최 인 호

연 구 원 : 심 상 희

연 구 원 : 전 상 식

연 구 원 : 이 은 주

협동연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 전 태 훈

협동연구기관명 : 성신여자대학교

산학협력단

협동연구책임자 : 전 용 필

협동연구기관명 : 을지대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 기 호

요 약 문

I. 제 목

돼지 정소-추출 스테로이드를 이용한 인체 질병 치료 및 남성 성기능 개선제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

남성호르몬은 정소에서 주로 만들어지며 남성의 생식기 발달뿐만 아니라, 근육 및 골격을 발달시키는 기능(아나볼릭 효과)을 가진 스테로이드 호르몬이다. 따라서 화학적으로 합성된 남성호르몬과 일반 남성호르몬보다 아나볼릭 효과가 더 큰 아나볼릭스테로이드 (화학적으로 합성한 남성호르몬의 유도체)는 빈혈 치료제, 골다공증 치료제, 소비성근육질환(AIDS 환자의 경우) 치료제, 남성 생식기능 저하 치료제, 피임약의 성분 등으로 사용되어왔다. 그러나 운동선수들이 근육강화를 통한 경기력 향상을 위해 과도하게 사용한 보고나 기타 복용 방법에 따른 부작용 보고에 따르면, 고지혈증, 정자 수 감소, 여성의 남성화 등의 부작용이 발생하여 사용이 금지되거나 제한되고 있다. 본 연구자는 nandrolone(또는 19-nortestosterone)과 19-norandrostenedione 이라는 인간을 포함한 다른 포유동물에서는 잘 만들어지지 않지만 아나볼릭 효과가 매우 큰 것으로 알려진 스테로이드가 돼지의 정소에서 대량 생산된다는 사실을 증명하였다. 또한 이 호르몬의 생리적 기능과 독성 연구를 수행하였으며, 이 호르몬을 정소에서 추출하여 마이크로캡슐화 하는데 성공하였다. 특히 일반 남성호르몬(testosterone)을 남성의 성기능이 저하된 환자에게 사용할 경우 남성의 생식기 내에서 5 α -dihydrotestosterone이란 강력한 남성호르몬으로 전화되어 전립선비대 또는 전립선암을 유발할 수 있는 반면 nandrolone의 경우 5 α -dihydrotestosterone로 전화되지 않기 때문에 남성 성기능 저하의 치료제로써의 가치가 높다.

따라서 본 연구에서는,

1. 각 질병치료에 최적으로 작용할 수 있는 돼지 정소-추출물의 분리와 정제 조건 및 조성을 확립하고,
2. 이렇게 확보된 돼지 정소-추출 스테로이드를 이용하여 인체세포와 실험동물에 미치는 독성 및 부작용과 남.여 생식기관, 면역기능, 그리고 노화방지에 미치는 영향을 연구하고,
3. 이러한 전임상적 연구결과를 바탕으로 인체에 미치는 임상적 효과를 관찰한 후,
4. 치료제 개발에 필요한 약제화 기술을 개발하여,
5. 궁극적으로 돼지의 정소에서 추출한 천연 아나볼릭스테로이드를 통해 남성 및 여성호르몬을 함유한 고부가 인체 질병치료제 및 남성 성기능 개선제를 개발하는 데 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

제1세부과제: 돼지 정소-추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발

- 1년차: 대량 생산 및 상품화를 위한 분리 및 정제 기술의 최적화, 호르몬 분석기술의 표준화 연구
- 2년차: 약제화 기술 개발 연구 및 인체 임상실험
- 3년차: 인체 임상 실험 및 산업화 연구

제1협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구

- 1년차: 돼지 정소-추출물에 있는 각 스테로이드 성분이 면역세포에 미치는 영향 연구
- 2년차: 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석 및 동물 실험 모델 확립
- 3년차: 돼지 정소-추출 스테로이드 함유물질의 투여에 따른 Graft versus host disease (GVHD) 모델을 이용한 분석

제2협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘상피 발달에 미치는 영향 연구

- 1년차: 간세포 및 암컷 생쥐를 이용한 독성과 난소기능에 미치는 영향 연구
- 2년차: 생쥐 배아의 착상 시 수반되는 자궁의 변화, 착상 이후 배아 발생, 젖샘의 발달 및 유방암에 미치는 영향 연구
- 3년차: 골수 내 조혈 줄기세포의 증식, 적혈구 수의 변화, 혈액 성상에 미치는 영향 연구

제3협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구

- 1년차: 흰쥐 지방세포와 간질세포 (Leydig cell)에 미치는 영향 및 독성 연구
- 2년차: 수컷의 번식력, 정소와 부정소, 전립선 등 생식기관에 미치는 영향 연구
- 3년차: 비만 억제 효과, 지방 분화와 증식에 미치는 영향 연구

IV. 연구개발결과

각 세부과제 및 협동과제별 연구결과의 요약된 내용은 다음과 같다.

제1세부과제: 돼지 정소-추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발

제1세부과제에서는 3개의 협동과제의 연구에 필요한 돼지 정소 추출 스테로이드의 제공을 위해 추출방법의 개발, 안정성 평가, 임상에 적용 및 대량생산 기술 개발에 초점을 두어 연구하였다. 핵심 연구 내용은 다음과 같다.

가) 돼지 정소에서 가장 효율적으로 스테로이드 호르몬을 다량 분리·정제하기 위한 방법을 확립하였다.

나) 추출비용과 *in vitro* 및 전임상 연구 결과에 가장 부합되는 최적 조건을 확립하였다.

다) 참여기업과 공동으로 대량 생산 체제를 확립하였다.

라) 추출한 스테로이드의 정량, 정성 분석기술을 표준화 하였다.

- 마) 약제화에 대한 최적 조건을 확립하고 인체 임상실험을 실시하였다.
- 바) 돼지 정소추출물이 동물의 창상 치료에 미치는 효과를 관찰하였다.
- 사) 돼지 정소추출물이 동물에 미칠 수 있는 부작용에 관해 연구하였다.
- 아) 돼지 정소추출물의 대량생산 기술과 산업화 방안에 관해 모색하였다.

제1협동과제:

- 가) T 세포의 활성화에서 돼지 정소 추출물의 효과를 밝혀내고 어떻게 돼지의 정소 추출물이 T 세포의 활성을 조절하는지를 연구하였다.
- 나) 돼지 정소 추출물이 T 세포의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해서 MTT 분석과 CFSE 표지분석을 이용하여 돼지 정소추출물의 유무에 따른 항원특이적인 T 세포의 분열을 측정하였다. 또한 RT-PCR 분석과 ELISA 분석을 통하여 돼지 정소 추출물의 유무에 따른 항원특이적인 T 세포의 IL-2와 IFN- γ 의 분비를 확인하였다.
- 다) 돼지의 정소 추출물이 T 세포의 활성화에 어떤 영향을 주는지 규명하기 위해서 돼지 정소 추출물의 유무에 따른 항원특이적인 T 세포의 세포주기와 세포주기의 조절과 관련된 몇몇 분자들의 발현양상을 분석하였다.
- 라) 돼지 정소 추출물이 p27^{kip}을 안정화시킴에 의해서 S기에 세포주기정지를 일으켜 T 세포분열을 억제함을 제시했다. 결국 본 연구를 통해서 얻어진 결과에 따르면, 돼지 정소 추출물이 p27^{kip}을 안정화하여 세포주기가 S기에 정지함에 따라 T 세포분열을 억제하여 나타나는 면역억제효과 나타내었다. 그러므로 돼지 정소추출물은 새로운 면역억제요법의 좋은 후보물질이 될 수 있다.

제2협동과제:

- 가) 돼지 정소유래 스테로이드 호르몬 복합물이 여성에게서 생식주기, 배란 등을 억제하거나 촉진하지 않는 조건에서 사용될 수 있는 조혈줄기세포 증식 촉진제로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- 나) 정소 추출 스테로이드 처리 후 암컷에서 태어난 암컷의 생식능력에 영향이 없이 적혈구 세포 수 증가와 헤모글로빈 양 증가함이 관찰되었다.
- 다) 결과적으로 돼지 정소유래 스테로이드가 여성의 나이에 관계없이 사용될 수 있는 빈혈 치료제로 개발 될 수 있음을 확인하였다.

제3협동과제:

- 가) 세포주를 사용한 in vitro 연구에서 정소 추출 스테로이드의 처리 기간과 농도에 따라 지방 세포의 증식과 분화에 관여하는 유전자의 발현에 영향을 미치는 것을 확인하였음.
- 나) 지방 세포의 wound healing 연구 방법을 사용하여 돼지 정소 추출 스테로이드는 지방세포의 증식을 억제하는 효과가 있음 증명하였음.
- 다) 돼지 정소 추출 스테로이드에 다량으로 존재하는 Nandrolone은 정소 내 간질세포의 증식을 야기함이 관찰되었음.
- 라) 숫쥐를 이용한 in vivo 연구에서 돼지 정소 추출 스테로이드 중 M4를 투여하였을 때 정소와 부정소의 무게가 변화하는 것이 관찰되었음. 그러나, 수출세관, 부정소(정소상체),

전립선에 형태학적 변화를 일으키지 않았음

- 마) in vivo 연구를 통해 숫 생쥐에 2주 동안 M4를 투여 하였을 때 정소에서 스테로이드 합성 관련 유전자의 발현을 증가시켰고 전립선에서 발현하는 특이 유전자의 발현을 증가시키는 것이 확인되었음. 따라서 돼지 정소 추출 스테로이드의 사용은 전체적으로 남성 생식 능력이나 기관에 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였음.
- 바) in vivo 연구는 M4를 숫쥐에 2주 동안 투여하였을 때 부정소와 내장 지방의 무게에는 영향을 미치지 않았지만, 내장 지방과 부정소 지방에서 지방 분화와 증식에 관여하는 유전자의 발현에 서로 다르게 영향을 미치는 것을 확인하였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

SUMMARY

I. Research Title: Development of Pharmaceutical Steroid-Extract from the Pig Testis for Human Disease Treatment and Male Sexual Function Regulation

II. Importance and Goal of the Research

Estradiol, testosterone and other endogenous estrogens, androgens play critical roles in the functional development and activities of gonads and other tissues. Thus, these hormones and their synthetic pharmaceutical analogs also have well described anabolic activity. As compared to other mammalian species, the male pig produces extremely large amounts of these gonadal steroids. For example, 19-nortestosterone (nandrolone) is abundant in pigs and is readily detectable in blood plasma. The highest concentration of 19-nortestosterone in male pig plasma are observed between two and four weeks after birth when 19-nortestosterone concentrations are equivalent to adult boar plasma levels of dehydroepiandrosterone sulphate, the most abundant androgen in the male pig. Sex steroids are known to be involved in skeletal muscle development (anabolic effect) and are frequently used in the medicines. Even though those steroids have been used as a key components of the several medicine for the disease treatment, there is few research for the development of medicine by use of these natural steroids endogenously synthesized in pig. Therefore, the goals of the present research was to establish the technology to purely isolate the steroid from the gonad of the pig and to investigate those steroid extract for the purpose of drug development for human disease.

III. Results

Three different methods (M1, M2, and M3) were developed for the isolation and purification of the steroids from the porcine tissues. Among three extraction methods we developed, M3 was the best method with respect to the quantities of steroids and the induction of muscle satellite cells (MSCs). In addition, sex hormones have long been considered to play an important role in bone turnover rate, periodontal diseases and wound healing. We have studied the effect of porcine testis steroid extract (PTSE), an extract of porcine testes which holds a good ratio of 19-nortestosterone (nandrolone), testosterone, androstenedione, 17β -estradiol, and estrone on the healing rate of a standardized full thickness linear wound on the back of the rat. The animals were treated with the PTSE cream, cream and Vaseline (control) to find-out the effect in re-epithelialization, contraction and formation of granulation and scar tissues. Histological examination after 21 days showed 100, 87.4 and 80.5% recovery of epidermis, dermis and hypodermis, respectively in the PTSE treated animals. Similarly on the 15th day of treatment, complete healing with intact skin was observed in the PTSE cream treated animals among the laser therapy group.

We also examined the effect of porcine testicular extract on T cell activation and studied the mechanism how porcine testicular extract modulate T cell activity. To test the effect of porcine testicular extract on T cell activity, we measured antigen-specific T cell proliferation by MTT assays and CFSE labeling assays in the presence or absence of porcine testicular extract. Also we determined IL-2 and IFN- γ secretions of antigen-specific T cells by RT-PCR analyses and ELISA assays in the presence or absence of porcine testicular extract. To define the mechanism on how porcine testicular extract effects T cell activity, we further analyzed cell cycle of antigen-specific T cells and the expression patterns of several molecules involved in the regulation of cell cycle in the presence or absence of porcine testicular extract. As a result, there was decrease in antigen-specific T cell proliferation with the treatment of porcine testicular extract on dose-dependent manners. Also, IL-2 and IFN- γ secretions of antigen-specific T cell were decreased in the treatment of porcine testicular extract. Moreover, cell cycle analysis revealed that the treatment of porcine testicular extract causes cell cycle arrest in the S phase of antigen-specific T cells. Further study indicated that porcine testicular extract inhibits T cell proliferation through cell cycle arrest in S phase by stabilizing p27^{kip}. Our results indicated that porcine testicular extract has an immunosuppressive effect by inhibiting T cell proliferation through cell cycle arrest in S phase by stabilizing p27^{kip}. Thus, porcine testicular extract may be a good candidate for the new immunosuppressive regimen.

It was concluded that pig testis-derived steroid-complex can be used in female without disturbing the cyclicity of reproductive cycle and the ovulation. Besides, pig testis-derived steroid-complex induced the increase of the number of red blood cells and the amount of hemoglobin without disturbing of the reproductive ability of F1 female. Based on these results, we proved that the pig testis-derived steroid-complex can be used as a therapeutic agent for anemia. It suggest that pig testis-derived steroid-complex can be used as a medicine in all age of female for anemia.

In vitro experiments, using adipocyte cell line, pig testis-derived steroid complexes enhanced expression of genes involving in fat cell differentiation and proliferation. Similarly, wound healing experiment using adipocyte cell line showed a possible role of pig testis-derived steroid complexes on reduction of fat cell proliferation. Pig testis-derived steroid complexes likely involve in the proliferation of Leydig cells in the testis. Treatment of M4 for 2 weeks into experimental mice resulted in increases of testicular and epididymal weights. However, treatment of M4 for 2 weeks did not affect on morphology of the efferent ductules, epididymis, and prostate. Treatment of M4 for 2 weeks resulted in increased gene expression involved in steroidogenesis and expression of genes specific in the prostate. Thus, pig testis-derived steroid complexes would not affect the male reproduction and male reproductive tissues. In addition, in vivo experiment on treatment of M4 into experimental mice for 2 weeks didn't influence weight of the epididymal and abdominal fat.

CONTENTS

Chapter 1. Research Title

Chapter 2. Importance and Goal of the Research

Chapter 3. Results

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구 개발의 목적
2. 연구 개발의 중요성 및 필요성
 - 가) 경제적·산업적 중요성
 - 나) 연구 개발의 중요성
3. 연구 개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준
2. 국내 수준
3. 국내·외 연구 현황

제 3 장 연구개발 내용 및 결과

1. 제1세부과제 : 돼지 정소 추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발
2. 제1협동과제 : 돼지 정소 추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구
3. 제2협동과제 : 돼지 정소 추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향 연구
4. 제3협동과제 : 돼지 정소 추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향연구

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문게재성과
2. 특허 성과
3. 실용화 방안

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

남성호르몬은 정소에서 주로 만들어지며 남성의 생식기 발달뿐만 아니라, 근육 및 골격을 발달시키는 기능(아나볼릭 효과)을 가진 스테로이드 호르몬이다. 따라서 화학적으로 합성된 남성호르몬과 일반 남성호르몬보다 아나볼릭 효과가 더 큰 아나볼릭스테로이드 (화학적으로 합성한 남성호르몬의 유도체)는 빈혈 치료제, 골다공증 치료제, 소비성근육질환 (AIDS 환자의 경우) 치료제, 남성 생식기능 저하 치료제, 피임약의 성분 등으로 사용되어왔다. 그러나 운동선수들이 근육강화를 통한 경기력 향상을 위해 과도하게 사용한 보고나 기타 복용 방법에 따른 부작용 보고에 따르면, 고지혈증, 정자 수 감소, 여성의 남성화 등의 부작용이 발생하여 사용이 금지되거나 제한되고 있다.

최근 본 연구자는 nandrolone(또는 19-nortestosterone)과 19-norandrostenedione이라는 인간을 포함한 다른 포유동물에서는 잘 만들어지지 않지만 아나볼릭 효과가 매우 큰 것으로 알려진 스테로이드가 돼지의 정소에서 대량 생산된다는 사실을 증명하였다. 또한 이 호르몬의 생리적 기능과 독성 연구를 수행하였으며, 이 호르몬을 정소에서 추출하여 마이크로캡슐화 하는데 성공하였다. 특히 일반 남성호르몬 (testosterone)을 남성의 성기능이 저하된 환자에게 사용할 경우 남성의 생식기 내에서 5 α -dihydrotestosterone이란 강력한 남성호르몬으로 전화되어 전립선비대 또는 전립선암을 유발할 수 있는 반면 nandrolone의 경우 5 α -dihydrotestosterone로 전화되지 않기 때문에 남성 성기능 저하의 치료제로써의 가치가 높다.

따라서 본 연구에서는,

1. 각 질병치료에 최적으로 작용할 수 있는 돼지 정소-추출물의 분리와 정제 조건 및 조성을 확립하고,
2. 이렇게 확보된 돼지 정소-추출 스테로이드를 이용하여 인체세포와 실험동물에 미치는 독성 및 부작용과 남.여 생식기관, 면역기능, 그리고 노화방지에 미치는 영향을 연구하고,
3. 이러한 전임상적 연구결과를 바탕으로 인체에 미치는 임상적 효과를 관찰한 후,
4. 치료제 개발에 필요한 약제화 기술을 개발하여,
5. 궁극적으로 돼지의 정소에서 추출한 천연 아나볼릭스테로이드를 통해 남성 및 여성호르몬을 함유한 고부가 인체 질병치료제 및 남성 성기능 개선제를 개발하는 데 있다.

2. 연구개발의 중요성 및 필요성

1) 경제적·산업적 중요성

바야흐로 세계는 글로벌 경제 체제로 돌입하고 있다. 이제 경제·통산이라는 측면에선 국가간의 국경도 없어져 가는 추세이다. 이러한 상황에서 미래를 대비한 고부가 첨단산업 기술의 확보는 국가의 존폐를 결정짓는다고 해도 과언이 아니다. 그 중에서도 생명 및 신약산업은 미래 핵심 산업이 될 것으로 주목받고 있다. 혹자는 우리나라 제약회사가 세계적인 회사로 성장하지 못하는 이유가 신약개발을 소홀이 하고 외국회사의 제품을 단순히 수입해서 파는 식으로 운영해 왔다고 지적한다. 국내 시판되고 있는 수 만종의약품 중에 우리가 직접 개발한 약은 11종 정도 밖에 되지 않는다고 한다.

실제로 우리나라 제약 산업의 규모는 10 조원(2006년 기준)이고 이중 1위를 차지한 동아제약의 2006년도 매출액은 5,800억 정도로 판매액만 고려하면 미국의 중소제약회사 규모밖에 안 된다고 한다. 더구나 5,800억의 매출액에는 한국인의 선호하는 음료인 ‘바카스’가 상당 부분을 차지한다고 보면 우리나라 제약회사의 규모를 짐작할 수 있다. 2006년도 세계의 제약 시장의 규모는 약 6,340억 달러(한화 약 6백 30조원)이라고 한다. 미국과 일본이 각각 제약시장의 1위와 2위를 차지하고 있다. 미국의 한 제약회사인 Pfizer가 개발한 ‘리피토’라는 콜레스테롤 저하제의 2006년도 매출액이 136억 달러 (한화 13.6조원)이라고 하면 제약개발의 고부가 가치성을 이야기하기에 충분할 것 같다.

< 표 1 > 2004년도 세계 약품 매출 순위 50대 품목

순 위	약 품 명	매 출 액 (단위: 백만\$)	치 료 목 적	회 사 명
7	Procrit/Eprex	3,589	빈혈	Johnson&Johnson
12	Fasamax	3,160	골다공증	Merck & Co
19	Epogen	2,601	빈혈	Amgen
21	Aranesp	2,473	빈혈	Amgen
38	Viagra	1,678	발기부전	Pfizer

<표 1>은 실제로 2004년도 세계 약품 판매 순위 50위 안에 들어가는 것 중 우리 연구팀이 본 과제를 통해 개발하고자 하는 품목과 연관이 있는 것을 나타내는 표이다. 매출 순위 50위에 들어가는 약품 중 3개가 본 연구팀의 가장 큰 관심사 중에 하나인 빈혈치료제이며, 이 세 품목에 대한 2004년도 매출액만 해도 약 87억 달러에 해당한다. 본 과제에서 주안점을 두고 있는 또 하나의 목표 치료제인 성기능 개선제와 연관된 발기부전치료제인 Viagra의 2004년도 매출액은 약 17억 달러에 해당된다. 따라서 본 과제와 연관된 그 밖의 치료약의 매출액을 고려한다면 그 부가 가치는 매우 클 것으로 사료된다.

2) 연구개발의 중요성

앞의 연구 목표에서 간략히 소개한 것처럼 화학적으로 합성된 남성호르몬과 남성호르몬의 유도체는 인체 치료약품으로 사용되어온 반면에, body builder 들의 근육 발달, 운동선수들의 경기력향상 등 치료목적과 관계없이 과다 복용할 경우 부작용이 우려되는 금지 약물의 이중적

성격을 가진 물질이다.

하지만 본 연구에서 개발하고자 하는 치료제는 화학적으로 합성된 것이 아니고 돼지의 정소에서 추출하는 천연물질이라는 큰 차이점을 갖고 있다. 그 이유는 아직 정확히 모르지만 돼지는 진화적으로 우리가 이 물질을 과다복용 시 발생하는 문제점 없이 살아갈 수 있는 체내 특이한 시스템을 갖추고 있는 것으로 추정된다. 또한 돼지 정소에서 추출해서 사용할 천연 아나볼릭 스테로이드를 포함하는 스테로이드 복합물은 인체에도 큰 부작용 없이 그 효능을 발휘할 것으로 사료된다.

전술한 바와 같이 이미 다양한 인체치료제의 성분으로 사용하는 합성된 아나볼릭스테로이드가 돼지의 체내에서 특이하게 많이 생산된다고 알려져 있지만 이 천연추출 호르몬의 정확한 생리기전이나 인체에 투여했을 때의 효과에 대해선 연구된 바 없으며 본 연구자는 이 분야에 관해 17년 가까이 연구해 온 경험이 있다. 돼지에서 이 호르몬이 만들어 진다는 사실에 대한 보고가 많지 않았고 이 호르몬이 약물로 취급되는 이유로 이 분야의 연구는 매우 미흡하다. 도축장에서 돼지의 정소는 대부분 폐기처분되기 때문에 이 경우 정소에서 유래된 다량의 이 호르몬들이 환경호르몬으로 버려질 수 있다. 본 연구를 통해 돼지의 정소 부산물을 활용하여 고부가 인체의약품을 개발할 경우 정부에서 추구하는 친환경적인 산업화에 부합된다고 할 수 있다. 또한 돼지고기 내에 이러한 약효가 좋은 우수한 성분이 있다는 것에 착안하여 ‘기능성 물질을 함유한 돼지고기’ 측면을 잘 홍보할 경우 소비자들의 돼지고기 소비를 증대시켜 줌으로써 최근 어려운 양돈농가에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

3. 연구개발의 범위

제1세부과제: 돼지 정소-추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발

- 1년차: 대량 생산 및 상품화를 위한 분리 및 정제 기술의 최적화, 호르몬 분석기술의 표준화 연구
- 2년차: 약제화 기술 개발 연구 및 인체 임상실험
- 3년차: 인체 임상 실험 및 산업화 연구

제1협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구

- 1년차: 돼지 정소-추출물에 있는 각 스테로이드 성분이 면역세포에 미치는 영향 연구
- 2년차: 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석 및 동물 실험 모델 확립
- 3년차: 돼지 정소-추출 스테로이드 함유물질의 투여에 따른 Graft versus host disease (GVHD) 모델을 이용한 분석

제2협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘상피 발달에 미치는 영향 연구

- 1년차: 간세포 및 암컷 생쥐를 이용한 독성과 난소기능에 미치는 영향 연구
- 2년차: 생쥐 배아의 착상 시 수반되는 자궁의 변화, 착상 이후 배아 발생, 젖샘의 발달 및 유방암에 미치는 영향 연구
- 3년차: 골수 내 조혈 줄기세포의 증식, 적혈구 수의 변화, 혈액 성상에 미치는 영향 연구

제3협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구

- 1년차: 흰쥐 지방세포와 간질세포 (Leydig cell)에 미치는 영향 및 독성 연구
- 2년차: 숫쥐의 번식력, 정소와 부정소, 전립선 등 생식기관에 미치는 영향 연구
- 3년차: 비만 억제 효과, 지방 분화와 증식에 미치는 영향 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계	<input checked="" type="checkbox"/>	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	-------------------------------------	--------	--	-----------	--

화학 산업이 발전한 서구 사회를 시작으로 동양 사회에 이르기 까지 새로운 화학물질의 축적은 자연환경의 급격한 변화를 야기하였고, 인류에게 있어서도 커다란 변화가 생겼다. 강하고 멋진 남성성이나 아름답고 매혹적 여성성을 높이기 위한 시도가 나날이 급증하고 있다. 이러한 시도들은 스테로이드 호르몬의 특성을 기반으로 하는 것이 주를 이루고 있으며, 이와 관련된 연구가 주를 이루고 있다.

하지만 돼지에서 이 호르몬이 생산 된다는 사실은 아직 많이 알려져 있지 않으며 이 천연 호르몬을 이용한 산업화의 실례는 없다.

2. 국내 수준

국내에서도 화학적으로 합성한 스테로이드 호르몬에 대한 연구는 여러 분야에서 활발하게 이루어지고 있고, 이미 다양한 인체치료제의 성분으로 사용하는 합성된 아나볼릭스테로이드가 돼지의 체내에서 특이하게 많이 생산된다고 알려져 있지만 이 천연추출 호르몬의 정확한 생리기전이나 인체에 투여했을 때의 효과에 대해선 연구된 바 없다.

3. 국내·외의 연구현황

스테로이드를 이용한 연구는 국내·외에서 활발하게 진행되고 있다. 그러나 현재까지 개발되어 온 합성 또는 체내에서 2차 산물의 기질 역할을 하는 제제들의 신체 항상성(물질대사, 신체조절, 면역 등)과 관련된 부작용이 지속적으로 보고됨에 따라 그 사용이 제한되고 있다. 최근에 들어서는 이러한 부작용을 줄이고자 조직 또는 기관 특이적 스테로이드 호르몬 길항제를 개발하는 노력이 경주되고 있다. 그러나 현재까지 알려진 조직특이성이 개체 수준에서 다른 결과를 보이고 있다.

하지만 천연호르몬을 이용한 연구사례는 거의 전무하다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
없 음	없 음	없 음

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제1세부과제 : 돼지 정소-추출 스테로이드의 정제기술 및 상품화 기술 개발

1. 대량 생산 및 상품화를 위한 분리 및 정제 기술의 최적화, 호르몬 분석기술의 표준화 연구

1) 다양한 추출방법을 활용한 스테로이드 분리정제 기술 개발

돼지 정소에서 가장 효율적으로 스테로이드 호르몬을 대량 분리·정제하기 위하여 부정소 및 상피 조직은 모두 제거하고 순수한 정소를 분리하였다. 분리한 정소는 조직균질기로 갈기 위해 10-30 g 크기로 미리 잘라서 -20℃ 냉동고에 얼려 보관하였다. 정소의 지방을 추출하기 위한 용매는 클로로포름/메탄올 (50/50, v/v) 혼합용액을 사용하였다. 1000 mL 비이커에 25-50g 사이의 정소 조각을 넣고 8배의 클로로포름/메탄올 혼합용액을 붓고 3분간 균질화 하였다. 균질화가 끝난 후 Whatman (No. 2) 여과지를 사용해서 여기에 걸리는 잔존물은 모두 제거하였다.

Method 1 (M1)은 지방을 포함한 제품을 제조하기 위해 여과액을 모두 250 mL 분별 깔대기에 넣고 **0.9% 생리 식염수용액**을 소량 첨가하여 가볍게 흔들어 준 뒤 약 10분간 정치하였다. 분리된 아래층을 회수병에 넣고 상등액은 다시 한 번 생리식염수를 첨가하여 흔든 뒤 약 20분간 방치하고 이때 분리된 아래층을 회수병에 합쳤다. 이 과정을 한 번 더 실시하여 총 3회를 실시하고 아래층은 모두 같은 회수병에 넣는다. 회수병에 회수된 아래층은 아직 약간의 물 층이 포함되어 있으므로 24시간 동안 가만히 세워두었고, 정치하여 분리된 상층은 pasteur pipette 을 사용하여 모두 폐기하였다. 상층의 폐기 후에 남은 유기용매는 round 형태의 감압회전 농축기의 이용하여 농축 하였다.

Method 2 (M2)는 클로로포름/메탄올 혼합용액(=50/50, v/v)으로 정소로부터 다량의 지방과 기타 steroid성 물질을 먼저 추출한 용액을 Whatman No.2 여과지를 사용해서 여기에 걸리는 잔존물은 모두 제거하였다. 이를 회전 감압기를 사용하여 유기용매를 휘발시킨 후 남은 용액의 동량의 에탄올/증류수 혼합용액 (=85/15, v/v)을 넣고 잘 혼합하여 내용물을 섞어주었다. 여기에 **5M NaOH 용액** 첨가하고 80 ℃에서 45분간 중탕 후 상온으로 식혔다. **6N 황산용액**으로 pH를 2-3으로 조정하였다. 내용물은 분별 깔대기에 나누어 담고 에테르를 내용물의 1/2 만큼 넣은 후 흔들어 잘 혼합하고 10분간 가만히 정치하여 층 분리가 되도록 하였다. 층이 깨끗하게 분리 되면 아래층은 다시 새로운 분별 깔대기에 넣고 한 번 더 분리하여 되도록 많은 양을 추출 하였다. 그 후 아래층은 폐기하고 상층의 에테르를 모두 모아 증류수로 세척해서 정제하고 에테르 층만 회전 감압농축기에 넣고 완전 건조하여 농축하여 회수하였다.

Method 3 (M3)은 클로로포름/메탄올 혼합용액(=50/50, v/v)으로 정소로부터 다량의 지방과 기타 steroid성 물질을 먼저 추출한 용액을 Whatman No.2 여과지를 사용해서 여기에 걸리는 잔존물은 모두 제거하였다. 이를 **Sep-pak (waters. WAT 091139, sep-pak C18)**을 이용하여 분리 하였

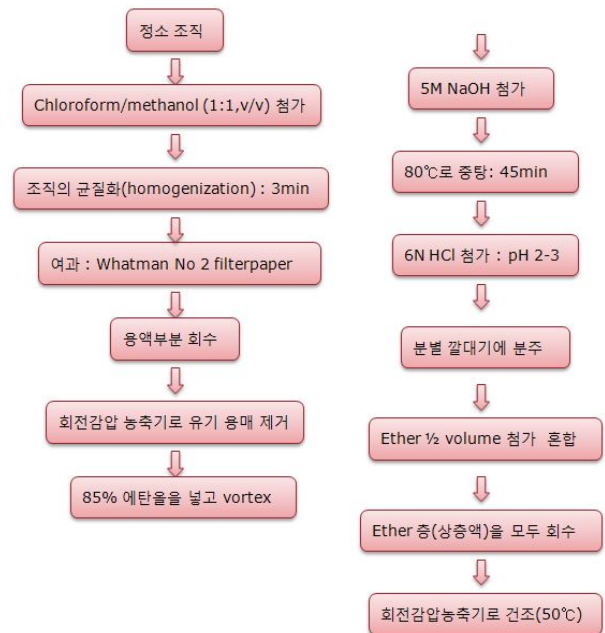
다. 그리고 이 용액을 질소로 건조한 후에 sodium acetate buffer를 첨가하였다. 여기에 5M NaOH 용액 첨가하고 80 °C에서 45분간 중탕 후 상온으로 식혔다. 6N 황산용액으로 pH를 2-3으로 조정하였다. 내용물은 분별 깔대기에 나누어 담고 에테르를 내용물의 1/2 만큼 넣은 후 흔들어 잘 혼합하고 10분간 가만히 정치하여 층 분리가 되도록 하였다. 층이 깨끗하게 분리 되면 아래층은 다시 새로운 분별 깔대기에 넣고 한 번 더 분리하여 되도록 많은 양을 추출 하였다. 그 후 아래층은 폐기하고 상층의 에테르를 모두 모아 증류수로 세척해서 정제하고 에테르층만 회전 감압농축기에 넣고 완전 건조하여 농축하여 회수하였다.

Method 4 (M4)는 클로로포름/메탄올 혼합용액(=50/50, v/v)으로 정소로부터 다량의 지방과 기타 steroid성 물질을 먼저 추출한 용액을 Whatman No.2 여과지를 사용해서 여기에 걸리는 잔존물은 모두 제거하였다. 그리고 이물질들을 분별 깔대기를 이용하여 **0.9% 생리 식염수용액**을 동량으로 첨가하고 가볍게 흔들어 준 뒤 약 10분간 정치하고 아래층을 회수하였다. 회수한 물질을 회전 감압기를 사용하여 유기용매를 휘발시킨 후 남은 용액의 약 3배의 에탄올/증류수 혼합용액 (=85/15, v/v)을 넣고 잘 혼합하여 내용물을 섞어주었다. 여기에 **5M NaOH 용액** 첨가하고 80 °C에서 45분간 중탕 후 상온으로 식혔다. **6N 황산용액**으로 pH를 2-3으로 조정하였다. 내용물은 분별 깔대기에 나누어 담고 에테르를 내용물의 1/2 만큼 넣은 후 흔들어 잘 혼합하고 10분간 가만히 정치하여 층 분리가 되도록 하였다. 층이 깨끗하게 분리되면 아래층은 다시 새로운 분별깔대기에 넣고 한 번 더 분리하여 되도록 많은 양을 추출하였다. 그 후 아래층은 폐기하고 상층의 에테르를 모두 모아 증류수로 세척해서 정제하고 에테르층만 회전 감압농축기에 넣고 완전 건조하여 농축하여 회수하였다.

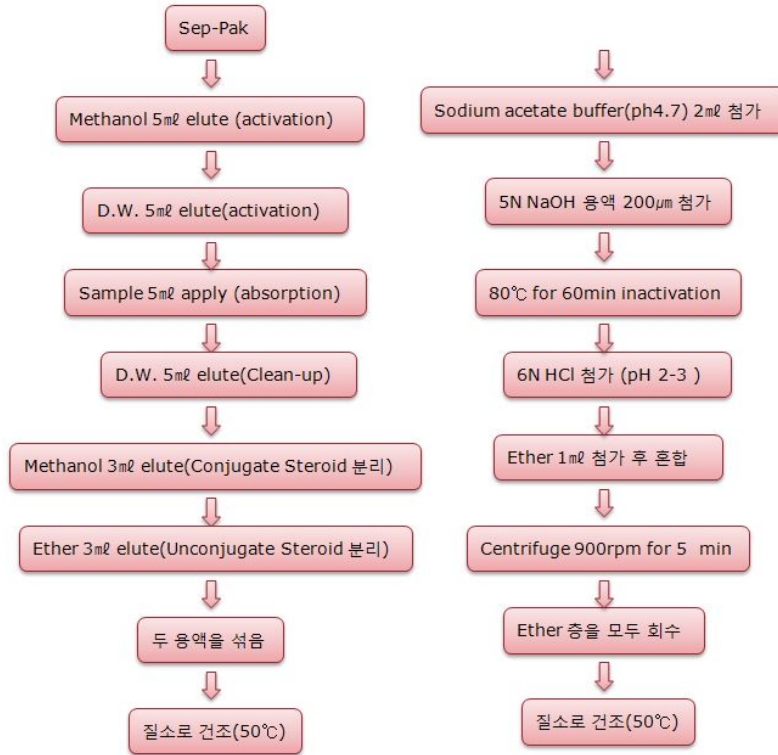
< M1 > 0.9% 생리 식염수용액을 이용한 분리 방법



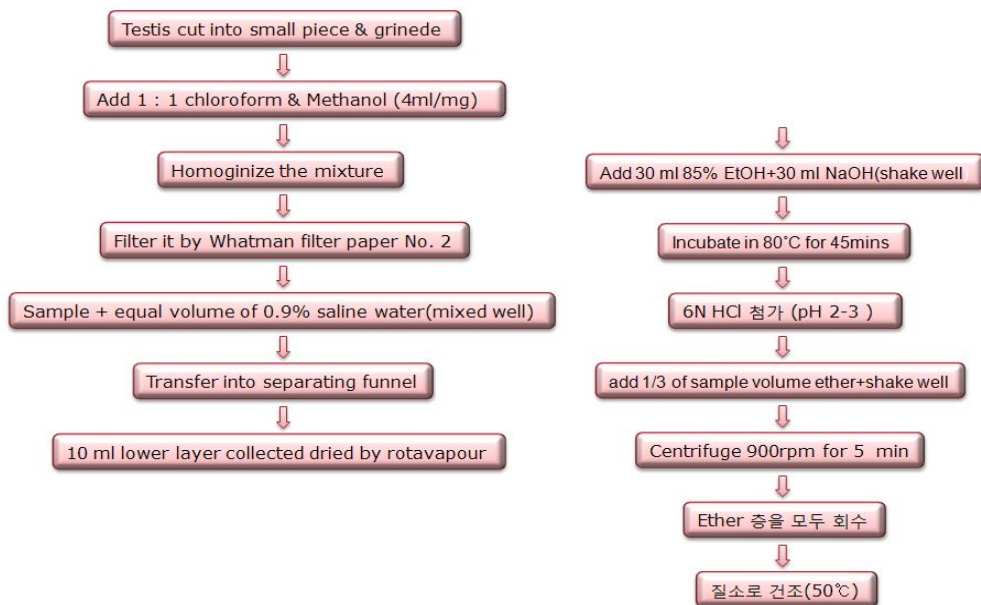
< M2 > NaOH와 HCl을 이용한 분리 방법



< M3 > Sep-pak을 이용한 분리 방법



< M4 > 0.9% 생리 식염수용액, NaOH와 HCl을 이용한 분리방법



< 그림 1 > 돼지 정소에서 스테로이드 추출 과정

<그림 1>은 돼지 정소에서 각기 다른 방법을 이용하여 스테로이드 분리·정제기술 확보 하였다. M1은 0.9 % 생리 식염수용액을 이용하여 추출한 방법, M2는 NaOH와 Hcl을 이용한 분리 방법, M3은 Spe-pak을 이용한 분리방법, M4는 0.9 % 생리 식염수용액, NaOH와 Hcl을 이용한 분리 방법이다.

< 표 2 > 돼지 정소 1g에서 추출된 호르몬 양

	M1	M2	M3	M4
Nandrolone(ng/g)	3.24	4.01	1.38	118.78
Testosterone(ng/g)	13.00	17.18	3.63	56.29
Androstenedione(ng/g)	0.41	0.40	0.07	2.53
Estradiol(ng/g)	0.68	0.68	0.08	10.19
Estrone(ng/g)	0.40	1.37	0.27	7.63

<표 2> 는 각기 다른 방법을 이용하여 스테로이드 호르몬을 분리 정제한 결과이다. 그리고 0.9 % 생리 식염수용액, NaOH와 HCl을 이용하여 분리한 M4에서 정소 1g을 추출할 때 가장 많은 스테로이드 호르몬을 분리 정제 할 수 있었다.

2) 추출비용과 *in vitro* 및 전임상 연구 결과에 가장 부합되는 최적 조건 확립

<표 3> 은 추출비용을 단계적으로 사용되는 소모품을 기준으로 산정하였다.

< 표 3 > 추출 방법에 따른 비용

	10 g 추출 비용(원)
M1	10,000
M2	15,000
M3	41,000
M4	25,000

그 결과 추출비용은 M3 > M4 > M2 > M1이고, 1 g당 스테로이드 호르몬의 추출량은 M4 > M2 > M1 > M3로 나타났다.

In vitro 및 전임상 연구에 부합하는 실험으로 기형아 유발성, 수태장애등을 실험동물로 이용하여 생식독성을 보았다. 시험 방법은 마우스 25 마리를 이용하여 각각의 추출물을 2일 간격으로 투여 하였다. 그리고 교미를 시켜 태어난 마우스를 관찰한 결과는 <표 3>과 같다.

그 결과 추출 방법에 따른 대조군의 비교에서 산자의 숫자나 기형아 유발성의 차이는 없으므로 확인되었다.

<표 4> 생식독성에 미치는 영향

		산자 수	상태
대조군		11±2.0	양호
M1	10%	9±2.0	양호
	50%	11±1.5	양호
M2	10%	10±1.5	양호
	50%	10±2.0	양호

3) 참여기업과 공동으로 대량 생산 체제 확립

추출물의 수요량 증대에 대비해 대량생산체제를 확립하기 위하여 안정적인 정소를 공급하고 저비용으로 많은 양의 스테로이드를 분리하는 기술을 개발하였다. 먼저 정소의 원활한 공급을 위하여 국내 수퇘지의 도축 두수(2008년 기준 : 월평균 13,00 두, 1년 평균 159,00 두)를 조사하고 도축장을 선정하여 접촉하였으며, 수집한 정소는 동결된 상태로 이동하며 보관을 위한 시설을 확충하였다.

정소에서 스테로이드 분리방법 결과로 지방을 제거하기 위하여 0.9% 생리 식염수용액, NaOH Hcl을 이용하여 분리한 M4에서 가장 많은 양을 분리하였으며 대량 생산 체제를 확립하였다.

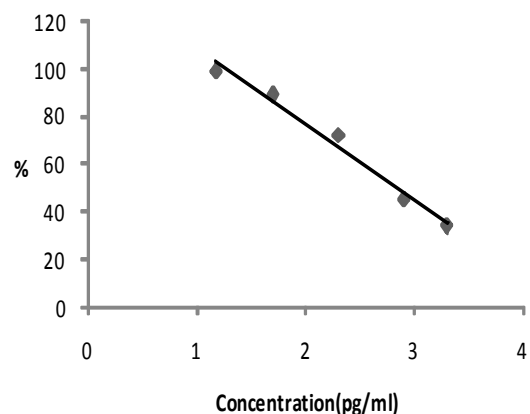
4) 스테로이드의 정량, 정성 분석기술의 표준화

여러 추출방법을 이용하여 돼지의 정소에서 추출된 추출물의 estrone (E1), estradiol (E2)19-nortestosterone(nandrolone), testosterone, androstenedione 양을 측정하였다.

가) 에스트론 (Estrone) 분석: Estrone ELISA (DRG. EIA-4174)

각 well에 control, 샘플, standard 50 ul를 분주하고 Enzyme conjugate 100 ul씩 첨가한 후 1시간 동안 실온에서 방치한다. 방치를 마친 분석플레이트는 washing buffer로 4번 세척 후 Substrate solution 150 ul 첨가하여 30분 동안 방치하였다. 30분 후 stop solution 50 ul 첨가, 450nm로 측정 하였다.

pg/ml	Standard O.D
0.00	1.79
15.00	1.77
50.00	1.60
200.00	1.29
800.00	0.81
2000.00	0.61

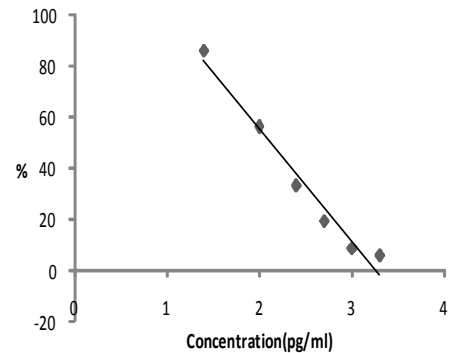


Sample	희석배수	추출물 농도 (ng/g)	Average	ng / g정소
M1	1X	39	<u>38</u>	0.40
	3X	36		
M2	20X	146	<u>133</u>	1.37
	60X	121		
M3	20X	7073	<u>7173</u>	0.27
	60X	7274		
M4	30X	332	<u>342</u>	7.63
	90X	352		

나) 에스트라디올(Estradiol) 분석 : Estradiol ELISA (DRG. EIA-2693)

각 well에 control, 샘플, standard 25 ul를 분주하고, Enzyme conjugate 200 ul 씩 첨가한 후 1 시간 동안 실온에서 방치한다. 방치를 마친 분석플레이트는 washing buffer로 3번 세척 후 Substrate solution 100 ul 첨가하여 15분 동안 방치하였다. 15분 후 stop solution 50 ul를 첨가, 450 nm 로 측정하였다.

pg/ml	Standard O.D
0.00	1.66
25.00	1.43
100.00	0.93
250.00	0.55
500.00	0.32
1000.00	0.14
2000.00	0.09

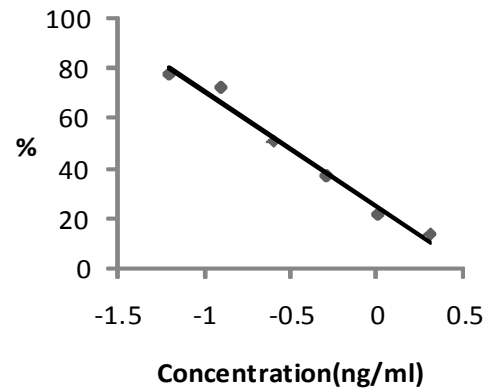


sample	희석배수	추출물 농도 (ng/g)	Average	ng / g정소
M1	1X	62	<u>65</u>	0.68
	9X	67		
M2	1X	64	<u>66</u>	0.68
	9X	68		
M3	10X	2444	<u>2257</u>	0.08
	90X	2071		
M4	20X	459	<u>457</u>	10.19
	60X	456		

다) 난드로론 (nandrolone)분석: 19- Nortestosterone-EIA (Euro-Diagnostica B. V. 5082NOR1p)

1개의 well에 zero standard 100 ul 첨가 후 나머지 well에는 zero - 6 standard 50 ul 첨가하고, 분석할 샘플을 50 ul씩 첨가 하였다. 100 ul zero standard를 제외한 나머지 well (standard 및 샘플 well)에 Enzyme conjugate solution 25 ul와 Antibody solution 25 ul을 넣었다. 앞 과정을 마친 plate는 은박지로 빛을 차단하고 4 °C에 1 시간 동안 둔 후 rinsing buffer 로 3 번을 세척 하였다. 세척을 마친 Plate 에는 Substrate solution 100 ul을 넣고 30분 동안 방치한 후 Stop solution 100 ul을 첨가하고 450 nm 에서 OD (optical density) 측정하였다.

ng/ml	Standard O.D
zero	0.04
zero'	1.46
0.0625	1.14
0.125	1.06
0.25	0.74
0.5	0.54
1	0.31
2	0.19

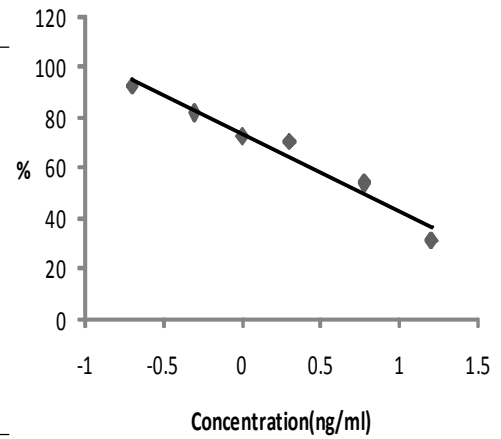


Sample	희석배수	추출물 농도 (ng/g)	Average	ng /g 정소
M1	6X	333	<u>308</u>	3.24
	18X	283		
M2	6X	338	<u>392</u>	4.01
	18X	395		
M3	120X	33795	<u>36930</u>	1.38
	380X	40065		
M4	200X	5303	<u>5335</u>	118.78
	800X	5367		

라) 테스토스테론 (testosterone) 분석: Testosterone ELISA (DRG. EIA-1559)

각 well에 control, 샘플, standard 50 ul를 분주하고, Enzyme conjugate 100 ul 씩 첨가한 후 1 시간 동안 실온에서 방치한다. 방치를 마친 분석플레이트는 washing buffer로 3번 세척 후 Substrate solution 150 ul 첨가하여 30분 동안 방치하였다. 30분 후 stop solution 100 ul를 첨가, 450 nm 로 측정하였다.

ng/ml	Standard O.D
0	1.54
0.2	1.43
0.5	1.27
1	1.12
2	1.09
6	0.83
16	0.47



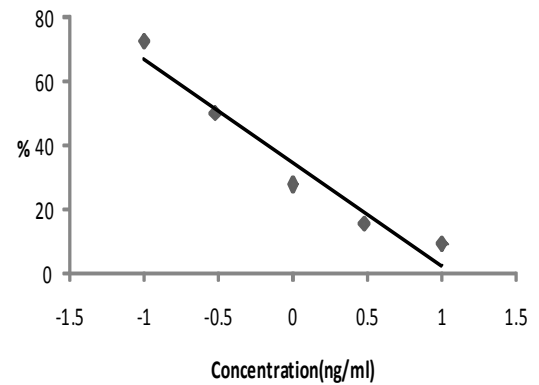
Sample	희석배수	추출물 농도 (ng/g)	Average	ng /g정소
M1	5X	1309	<u>1238</u>	13
	15X	1167		
M2	5X	1782	<u>1680</u>	17
	15X	1578		
M3	100X	92526	<u>96750</u>	3
	300X	100974		
M4	200X	2533	<u>2528</u>	56
	600X	2522		

마) 안드로스테디온 (Androstenedione) 분석: Androstenedione ELISA (DRG.

EIA-3265)

각 well에 control, 샘플, standard 20 ul를 분주하고, Enzyme conjugate 200 ul 씩 첨가한 후 1 시간 동안 실온에서 방치한다. 방치를 마친 분석플레이트는 washing buffer로 3번 세척 후 Substrate solution 200 ul 첨가하여 15분 동안 방치하였다. 15분 후 stop solution 100 ul를 첨가, 450 nm 로 측정하였다.

ng/ml	Standard O.D
0.00	1.41
0.10	1.03
0.30	0.71
1.00	0.39
3.00	0.22
10.00	0.13



Sample	희석배수	추출물 농도 (ng/g)	Average	ng /g 정소
M1	6X	41	<u>38</u>	0.41
	18X	35		
M2	6X	42	<u>38</u>	0.40
	18X	35		
M3	120X	1874	<u>1781</u>	0.07
	380X	1687		
M4	20X	111	<u>113</u>	2.53
	60X	115		

2. 약제화 기술 개발 연구 및 인체 임상실험

1) 약제화에 필요한 최적 조건 확립

가) 정소 추출물의 분리방법 선택

1차 년도에 돼지 정소에서 각기 다른 방법을 이용하여 스테로이드 분리정제 기술을 확보하였다. 그중에서 추출비용, 스테로이드 호르몬의 분리 정제량, 세포에 미치는 영향 등을 고려하여 약제화에 미치는 효과를 보기 위하여 M1(0.9 % 생리 식염수용액을 이용하여 추출한 방법) 과 M4 (0.9% 생리 식염수용액, NaOH와 Hcl을 이용한 분리 방법)를 선택하였다.

- 본 연구를 위해 사용한 돼지 정소 추출물 내 함유된 주요 스테로이드 성분 및 함량은 아래 <표 4>에 기술되어 있음

< 표 4 > M1, M4의 스테로이드 호르몬 조성

	M1(ng/g)	M4(ng/g)
Nandrolone	796	4458
Testosterone	2478	1780
Estradiol	1344	581
Androstenedione	125	138
Estrone	52	112

나) 정소 추출물을 이용한 크림 제조

정제수 200 g을 가온하면서 폴리소르베이트 15 g을 가하고 교반하여 분산한 후, 정소 추출물 M1, M4를 각각 8g씩 용해한 후 가하여 혼화하여 수상 조제액을 준비하였다. 그리고 가온 상태에서 인산이수소나트륨 5g, 에데트산나트륨 0.5 g을 순차적으로 가하여 용해하여 유상 조제액을 준비하였다. 가온 상태 앞서 준비된 유상 조제액에 수상 조제액을 가하여 혼화하고, 정제수 적량을 가해 1kg 중량을 맞춘 다음, 10,000 rpm 이상에서 균질화하면서 방냉하여 크림을 제조하였다. 이때, 첨가제로서, 세틸알코올, 스테아릴알코올, 이소프로필미리스테이트, 프로필렌 글리콜 또는 왁스류를 사용하였다. 그 결과 <그림2>과 같이 크림을 제조하였다.



<그림 2> 돼지-정소추출물을 이용한 크림

2) 임상연구를 통한 상품화 가능성 검증

본 연구에서 상품화 가능성을 검증하기 위하여 그림 2에서 제조된 정소 추출물 크림을 이용하여 창상에 미치는 영향을 조사하였다.

가) 실험동물 및 창상유도

체중 250g의 건강한 7주령 수컷 랫트를 실험환경에 적응시키기 위하여 1주일의 적응기를 거친 후 창상 치유에 미치는 효과를 보기 위하여 실험동물을 실험군(n=10)과 대조군(n=5)으로 나누었다. 창상의 유도는 먼저 99% diethyl ether로 흡입 마취시킨 후 등 부분의 털을 깨끗이 제거하고 75% alcohol로 피부를 소독하여 멸균된 상태로 직경 4.0mm biopsy punch를 이용하여 일률적으로 같은 크기가 되도록 피부, 피하조직, 육상층을 절개하여 개방창을 만들었다<그림 3>. 제조된 정소 추출물 M1, M4 크림을 1일 2회씩 도포하였다. 각 군에서 각각 1마리씩 무작위로 선택하여 3, 7, 14일째 창상의 육안적 변화를 관찰한 개체를 채혈한 후 희생시켜 조직학적 검사에 이용하였다. 채취된 조직의 모양이 흐트러지지 않도록 주의하여 10% formaldehyde에 고정시켰다.



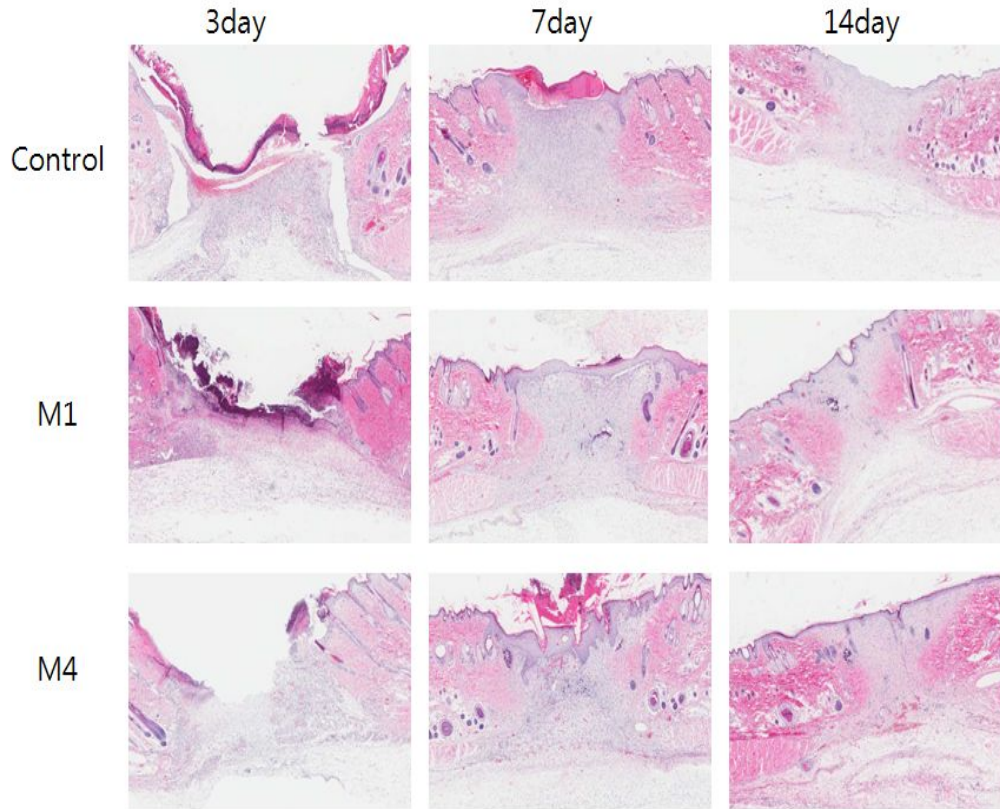
< 그림 3 > rat을 이용한 창상유도

나) 돼지 정소 추출물의 분리 방법에 따라 창상에 미치는 영향 (조직학적 소견)

조직학적 검사는 조직을 10% 중성 포르말린에 1-2일 고정한 후 파라핀에 포매한 후 4 μ m 두께로 세절하여 organosaline가 부착된 슬라이드(Probe-on plus slide, Fisher Scientific, USA)에 부착시켜 56 $^{\circ}$ C의 보온기에서 30분간 처리하고, 탈파라핀화 시키기 위해 자일렌으로 5분간 3회 고정시킨 후 100%, 90% 및 75% 에탄올에 각각 3분간 흡수과정을 수행하고 Tris 완충용액에 10분간 세척하였다. 헤마톡실린 & 에오신(H&E)로 염색하고 조직 표본의 손실을 방지하기 위하여 crystal mount로 봉입하고 현미경으로 관찰하였다.

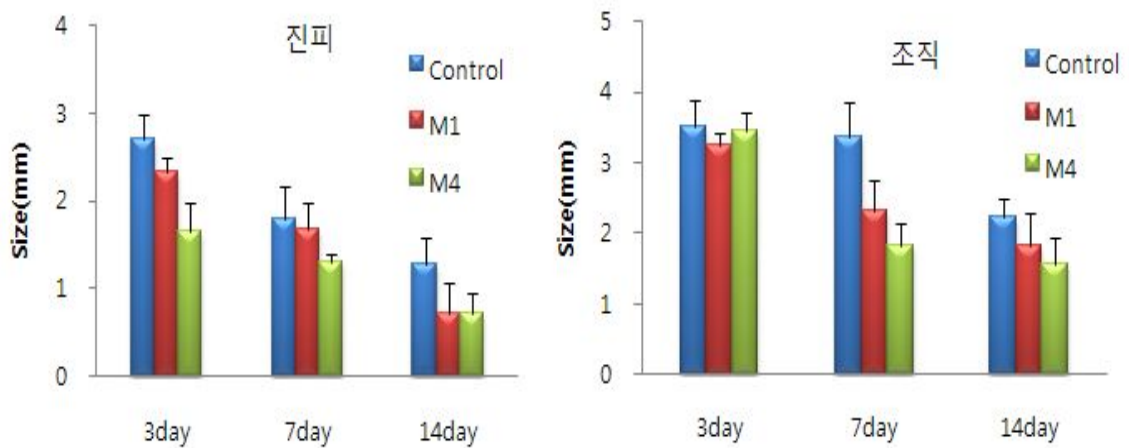
그 결과 대조군보다는 정소추출물 처리군에서 근섬유모 세포의 증식이 빨리 일어났으며, 규칙적인 교원질 침착으로 창상 후 치유과정을 호전시킬 수 있는 것을 관찰하였다. 초기에는 대조군에 비하여 염증성 변화, 육아종성 변화가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있고, 7일째에는 상피조직의 재생이 대조군에 비하여 현저하게 재생이 잘 된 것을 관찰할 수 있다. 14일째에는

근육층의 결합은 재생이 되지 않지만, 상피세포의 재생, 콜라겐층의 증실도, 반흔조직의 정도를 관찰하면 대조군보다 훨씬 깨끗하게 치유된 것을 확인할 수 있다. 따라서 대조군에 비하여 창상부위의 치유는 현저하게 증가하였고, 콜라겐층의 형성도 현저하게 증가된 것을 볼 수 있다.



< 그림 4 > 돼지 정소 추출물의 분리 방법에 따른 조직학적인 소견

다) 돼지 정소 추출물의 분리 방법에 따라 창상에 미치는 영향 (육안적 소견)

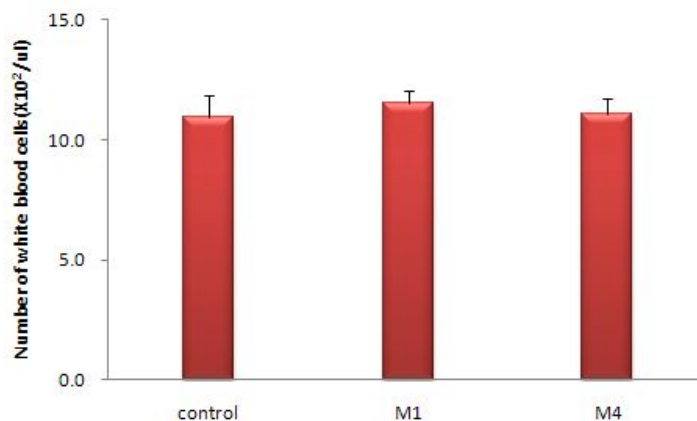


< 그림 5 > 돼지 정소 추출의 분리 방법에 따른 창상면적 비교

진피와 조직의 면적을 측정된 결과 아무런 약제도 도포하지 않은 control 군 보다 정소 추출물을 처리한 군에서 창상 면적의 감소가 빨리 일어났다. 조직의 경우 수술 3일째부터 감소가 일어나 14일 까지 급속히 진행되었다. 정소 추출물 M1과 M4의 비교결과 M4가 창상 면적이 더 빨리 감소되는 것을 관찰하였다.

라) 돼지 정소 추출물 크림의 안전성 평가

돼지 정소추출물 크림을 도포한 후 14일째 혈액을 채취하였고 혈액 응고를 막기 위하여 EDTA-2k가 들어있는 CBC 체혈병(BD Vacutainer)에 혈액 4ml취 한 후 5분 이상 혼합하여 백혈구(WBC) 수를 계산하였다. 그 결과 백혈구의 수는 대조군과 돼지 정소 추출물 크림군에서 유의한 변화는 없었다. 이러한 결과는 돼지 정소 추출물 크림제를 안전하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.



< 그림 6 > 크림의 안전성 평가

이상의 결과를 종합해보면 정소추출물을 이용한 크림을 제조 하였고, 창상을 유도한 rat에 도포한 결과 치료제로서 유용하고 안전하게 사용 될 수 있을 것으로 사료된다. 3차 년도에 지속적인 임상실험과 상품화에 필요한 대량생산 기술 등의 연구를 통하여 산업화가 가능할 것으로 추정된다.

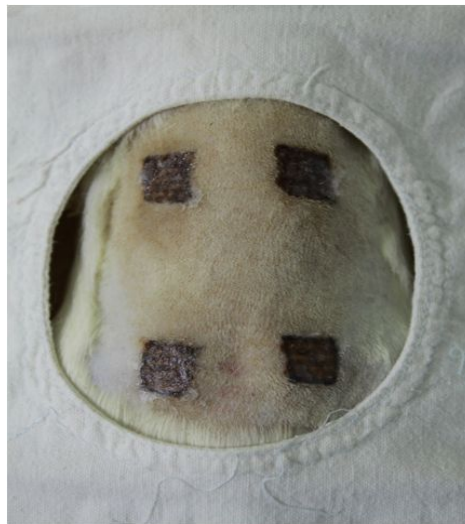
3. 인체 임상 실험 및 산업화 연구

1) 전임상 실험 : 정소 추출물 크림과 vaseline의 비교

전임상 연구를 위하여 영남대학교 병원의 피부과와 공동으로 레이저를 이용하여 rat의 창상을 유도하고 제조된 정소추출물 크림과 상품화되어서 판매하는 vaseline을 사용하여 비교 관찰하였다.

가) 전임상 실험을 위한 창상 유도

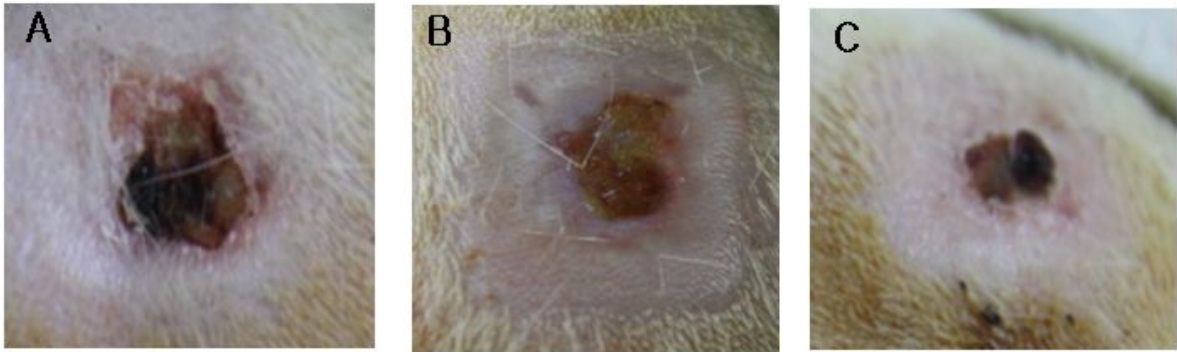
체중 450-500 gm의 건강한 10주령 수컷 랫트를 일정한 온도 및 습도의 사육사에서 사육하며 실험은 총 12마리를 이용하였다. 창상의 유도는 먼저 99% diethyl ether로 흡입 마취시킨 후 등부분의 털을 깨끗이 제거하고 75% alcohol로 피부를 소독하여 멸균된 상태로 rat의 피부에 2x2 cm 크기 square 4개에 de-epithelialization을 시행하기 위하여 Carbon dioxide (CO₂) laser with flashscanner (Sharplan 40C SilkTouch™)를 이용하였다(Ross et al,1997, Park et al, 2010). SilkTouch CO₂ laser system with a 4 mm spot diameter (F200)를 이용하여 25W, 0.2sec로 5회의 laser passes를 시행하였다(그림 7). 정소 추출물이 첨가되지 않고 제조된 크림(control), vaseline군, 정소추출물 첨가 크림(PTSE)군으로 나누어 1일 2회씩 도포하였다. 각 군에서 각각 1마리씩 무작위로 선택하여 6, 12, 15일째 창상의 육안적 변화를 관찰하고 희생시켜 조직학적 검사에 이용하였다. 채취된 조직의 모양이 흐트러지지 않도록 주의하여 10% formaldehyde에 고정시켰다.



< 그림 7 > Laser를 이용한 창상유도

• 육안적소견

크림 처리 후 15일째 관찰한 결과 창상면적은 PTSE군이 vaseline군과 대조군보다 많이 작아진 것을 관찰할 수 있었다<그림 8>. 특히 육아조직은 본래의 피부색과 비슷한 색조를 띠고 부종은 심하지 않아 피부표면과 같은 높이로 증식되었다.



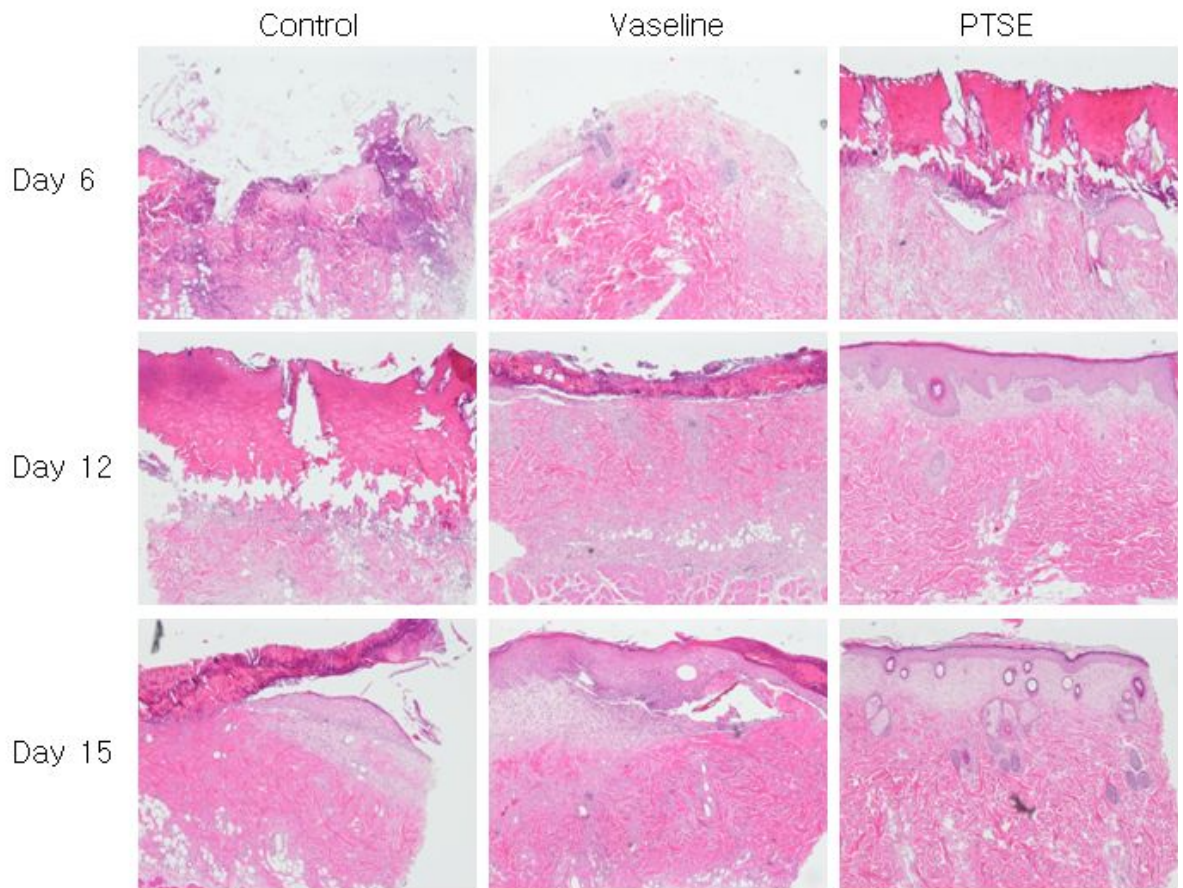
A) Control,

B) Vaseline,

C) PTSE

< 그림 8 > 크림처리 후 day 15

• 조직학적 소견



그 결과 도포 후 6일째는 Control군에서 전반적인 ulcer 소견 관찰된다. Vaseline군에서는 부분적인 re-epithelialization이 시작되고 있으며, PTSE군에서는 re-epithelialization과 함께 serum crust formation 관찰되었다. 도포 후 12일째는 Control군에서 serum crust formation이 나타나기 시작하였다. Vaseline군에서도 역시 serum crust formation 보이며, re-epithelialization 관찰되나 dermal-epidermal junction 부위에 cleft보이고 있다. PTSE군에서는 전반적인 re-epithelialization 진행되어 비교적 정상 skin structure 관찰되었다. 도포 후 15일째는 Control group에서 re-epithelialization이 시작되었으며, Vaseline group에서는 serum crust 사라지고 re-epithelialization이 진행되었으나 아직 D-E junction의 cleft가 남아있다. PTSE군에서는 비교적 정상 skin structure를 관찰 되었다. 따라서 정소 추출물군은 vaseline군 보다 창상치유에 더 효과적으로 관찰 되었다.

2) 산업화 연구

가) 철분주사제의 문제점과 개선안

현재 양돈 사업은 자돈의 빈혈로 인한 폐사 및 사양성적 부진의 이유로 많은 경제적 손실을 야기하고 있으며, 이를 위한 철분제에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있는 실정이나 현재 빈혈치료에 대한 명확한 대안이 나오지 않고 있으며, 사료 내에 함유된 철분은 어린자돈이 충족하기에는 턱없이 부족한 양이라 거의 100% 철분주사제를 유일하게 사용하고 있는 실정이다. 그러나 철분주사제의 맹점으로는 농장 내에 있는 수많은 자돈을 한 마리씩 잡아서 주사해야하므로 인력의 부담이 가중될 뿐만 아니라, 농장주들이 직접 접촉하여 부작용으로 염증, 상처 등이 생겨 상품의 질을 떨어트릴 수 있고, 주사로 인한 스트레스도 생겨 이에 따른 자돈의 폐사율(5~10%)도 높은 실정이며 이를 해결할 수 있는 대체제의 개발이 절실히 요구되고 있다.

본 연구는 철분주사제의 많은 문제점을 완전히 해소하기는 어렵겠지만 보다 적은 인력으로 상품의 품질에 영향을 주지 않는 대체제로서 조혈모세포 형성에 도움을 주는 돼지 정소-추출 스테로이드를 포함한 크림제를 개발하려 한다. 크림제의 경우는 자돈에 발라 주기만 하면 됨으로 인력 면에서 큰 도움이 될 뿐만 아니라 피부에 발라 주어 경피 흡수도 되며, 자돈끼리 핥아 주는 습성으로 경구로 흡수할 수도 있다.

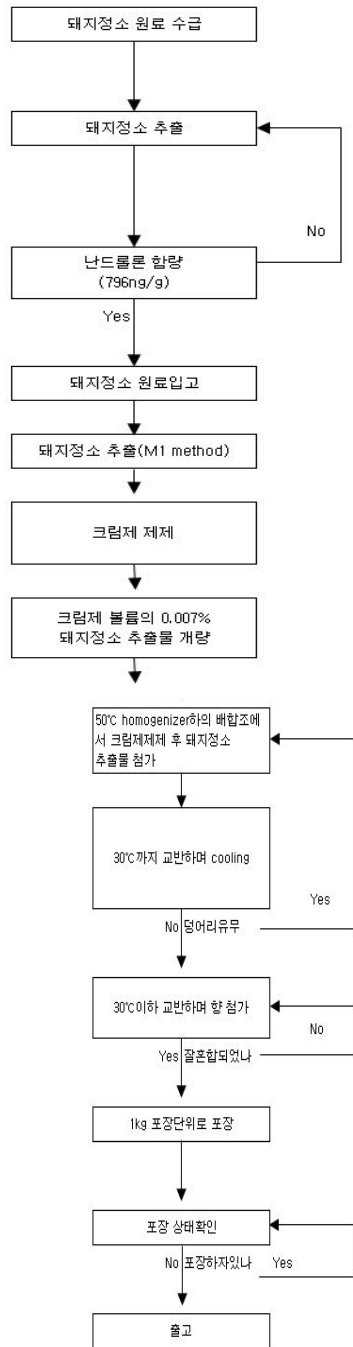
나) 철분주사제의 상품화와 대량생산 공정 개발

‘대한약전’에서 연고제와 크림제는 피부에 바르는 반고형 외용제이며 USP에서는 연고제를 기체의 물성에 따라 탄화 수소류 기체, 흡수성 기체, 유제성 기체, 수용성 기체의 4가지로 분류하고 있다. 이 중 유제성 기체인 유중수형 또는 수중유형의 반고형 유제는 크림제 라고 한다.

철분 주사제를 대체할 돼지 정소-추출 스테로이드를 포함한 크림제로 철분주사제를 대체하는 제품으로 상품화할 계획이며, 자돈 사양실험을 통하여 효능 평가를 할 것이다. 또한 효능평가를 하면서 돼지 정소-추출 스테로이드에 철분을 첨가하여 더욱 효율이 높은 자돈 빈혈 치료 크림제를 개발하는데 목표를 두고 있다.

다) 대량생산 기술공정

- ① 대량생산에 필요한 원료수급 ; 영남지역 도축장 및 서울 마장동에서 수급처 탐색
 영남대 수급처 : (주) 삼세 도축장(경북 영천시)



< 그림 8 > 대량 생산 공정도

② 철분주사제의 시장성 연구

양돈 산업의 시장성을 조사한 결과 2010년 12월, 2개월 미만의 자돈 수는 11,984 천두/년으로 철분 주사제는 보통 3일령 1번 접종을 한다. 본 제품의 가격은 500 원/두로서 2개월 미만의 자돈에게 1번 접종할 경우로 산정할 경우 시장규모는 연 59억9천만원정도이며 타사 자돈철분주

사제인 경우 농장 납품가가 보통 100 ml당 20,000원 정도로 책정되어 있으며 이는 400원/두로서 위와 같이 산정할 경우 시장규모는 연 47억 9 천만원 정도이다.

< 표 5 > 자돈철분주사공급제 시장 현황

회사	Brand name	소비자가격	주사 횟수	비고
Eagle Vet	Ferric aid	20,000원/100ml	3일령 1회, 2cc/piglet	수입
장백축산	글래토실	19,000원/100ml	3일령 1회, 2cc/piglet	수입
CTC	글랩토실	20,000원/100ml	3일령 1회, 1cc/piglet	수입
대성미생물	헤림200	12,000원/100ml	3일령 1회, 2cc/piglet	국산
삼우화학	겐다철	2,300원/50ml	3일령, 10일령 2회 2cc/piglet	국산
	삼우철분	2,000원/50ml	상동	국산

제1협동과제 : 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구

1. 돼지 정소-추출물에 있는 각 스테로이드 성분이 면역세포에 미치는 영향 연구

1) 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 면역세포(T 림프구, B 림프구)의 증식 및 항체 생성에 미치는 연구

돼지 특이스테로이드 함유 물질이 면역세포의 증식에 미치는 연구를 위하여 single TCR transgenic mouse인 OTII mouse의 비장 세포를 추출 후 주요 항원인 OVA peptide와 돼지 특이스테로이드를 농도별로 처리 한 후, 면역세포의 증식을 MTT assay로 측정 함. 이 때 사용되어진 비장 세포는 well 당 1×10^6 세포를 사용하였으며, OVA peptide는 well 당 10 ng 을 사용하였음. 생쥐 비장 세포의 배양 시 96 well plate를 사용했으며, CO₂ incubator에서 3 일간 배양 후 마지막 4 시간에 MTT를 처리하여 상대적인 proliferation rate를 측정하였음.

또한 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 항체 생성 능력에 미치는 영향을 연구하기 위해 생쥐의 비장세포에서 B 림프구를 분리하여 B 림프구의 증식을 MTT assay로 측정 함. 이 때 사용되어진 B 림프구는 well 당 1×10^6 세포를 사용하였으며, B 림프구는 96 well plate에서 배양하였음. 이때 B 림프구를 CO₂ incubator에서 3 일간 배양 후 마지막 4 시간에 MTT를 처리하여 상대적인 proliferation rate를 측정하였음.

이 때 사용되어진 돼지 특이스테로이드 함유 물질은 정제 방법에 따라 M1, M2, M3로 나뉨. 각 스테로이드 호르몬의 조성은 <표 1>과 같음.

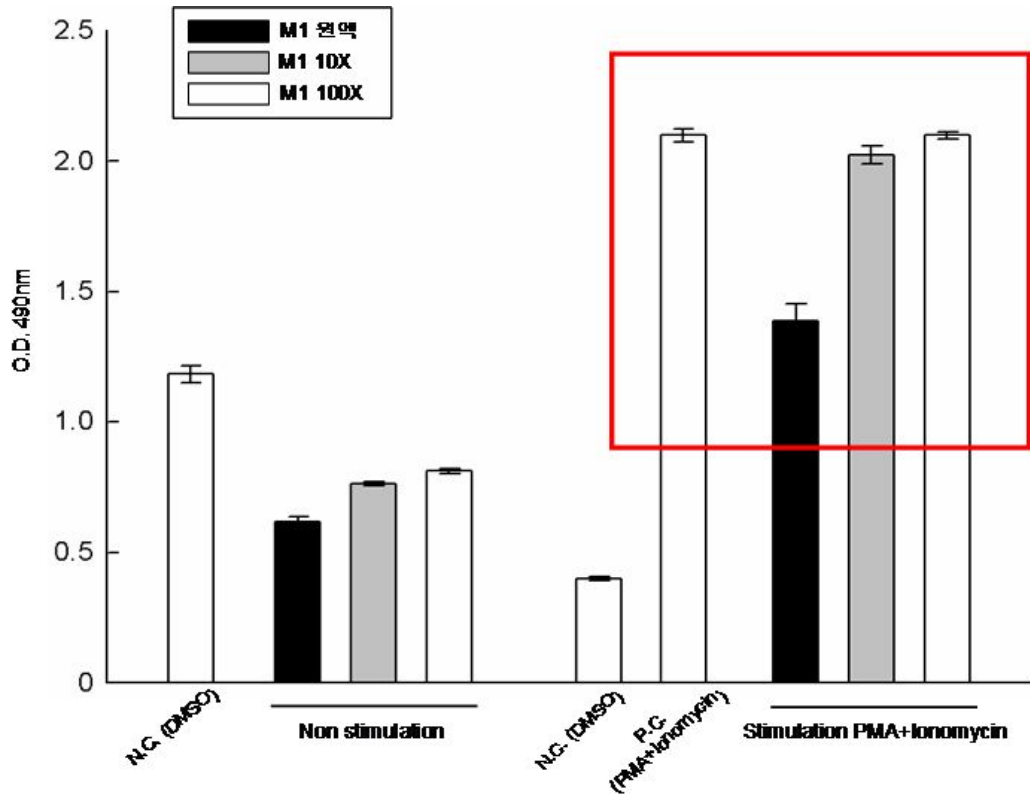
< 표 1 > M1, M2, M3의 스테로이드 호르몬 조성

	M1	M2	M3
Nandrolone	2.604 (µg/g)	3.190 (µg/g)	3.047 (µg/ml)
Testosterone	10.416 (µg/g)	13.742 (µg/g)	7.982 (µg/ml)
Androstenedione	325.080 (ng/g)	318.94 (ng/g)	146.940 (ng/ml)
Estradiol	547.180 (ng/g)	543.64 (ng/g)	186.270 (ng/ml)
Estrone	320.380 (ng/g)	1094.16 (ng/g)	591.83 (ng/ml)

그 결과 M1을 처리 한 실험군에서 면역세포의 분열이 감소되는 것을 MTT assay로 관찰하였음. 그 후 M1 추출물이 B 림프구의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해, M1을 처리 한 B 림프구의 세포 분열을 MTT assay로 관찰 하였지만 큰 차이를 안 보였음.

이러한 결과는 M1 추출물이 T 림프구의 활성화에 미치는 것으로 생각되며, 이러한 것을 뒷받침하기 위해 T 림프구를 PMA (10 µM) 와 ionomycin (10 ng)으로 자극 한 후 M1 추출

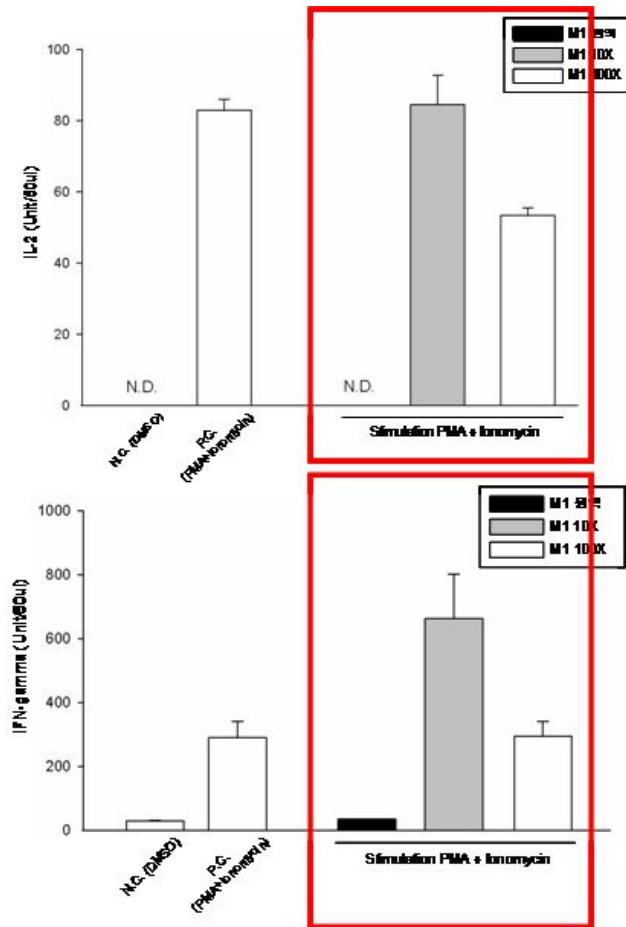
물의 효과를 MTT assay로 살펴보았음. 그 결과 T 림프구의 세포 분열이 M1 추출물과 dose-dependent 양상을 띠면서 감소하는 것을 발견하였음<그림 1>.



< 그림 1 > M1 추출물이 T 림프구의 세포분열에 미치는 영향 분석

2) 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 T 림프구의 cytokine 분비에 미치는 연구

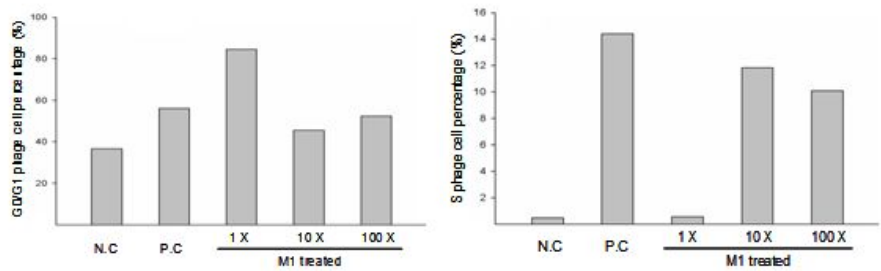
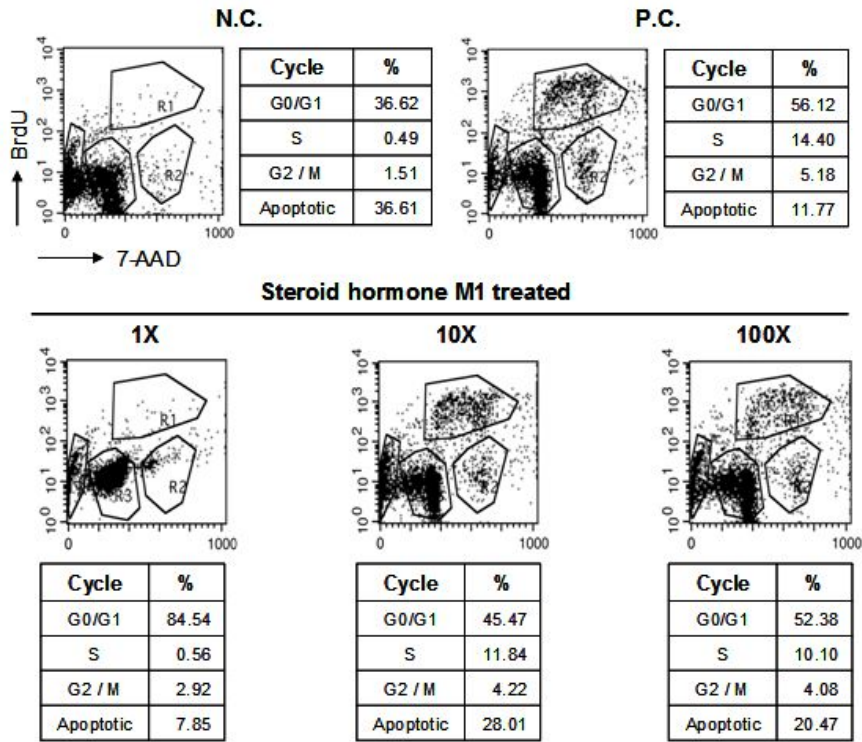
<그림 1>과 같이 M1 추출물이 T 림프구의 활성을 억제 하는 것을 발견하였음. 그 후 M1 추출물이 T 림프구의 cytokine 분비에 미치는 연구를 위하여 T 림프구를 PMA (10 μM) 와 ionomycin (10 ng)으로 자극 한 후, T 림프구의 특정 cytokine (IFN-γ, IL-2) 분비를 ELISA assay로 측정 함. 이 때 사용되어진 비장 세포는 well 당 1x10⁶ 세포를 사용하였으며, 생쥐 T 림프구의 배양 시 96 well plate를 사용했으며, CO₂ incubator에서 3 일간 배양 후 배양액을 회수하였음. 그 후 IFN-γ와 IL-2 분비 양을 ELISA assay로 측정하였음. 그 결과 그림 2와 같이 M1 추출물이 T 림프구의 특정 cytokine (IFN-γ, IL-2) 분비를 억제한다는 것을 밝혔음.



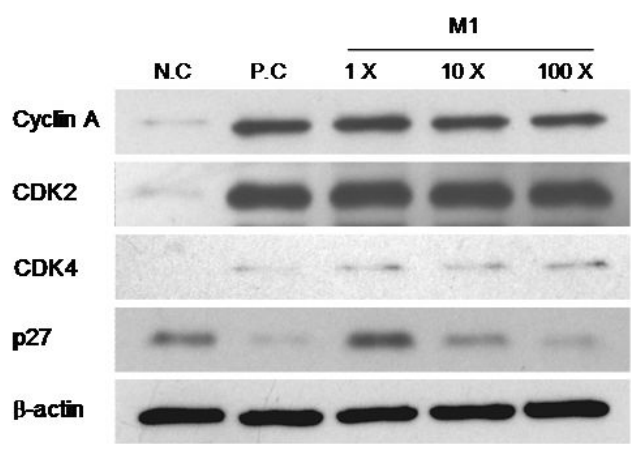
<그림 2> M1 추출물이 T 림프구의 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2) 분비에 미치는 영향 분석

3) 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 T 림프구의 세포 주기에 미치는 연구

돼지 특이스테로이드 함유 물질이 T 림프구의 cytokine 분비에 미치는 연구를 위하여 T 림프구를 PMA (10 μ M) 와 ionomycin (10 ng)으로 자극 한 후, 세포 주기에 미치는 연구를 유세포 분석기(flow cytometry)에 의해 측정하였음. 이 때 사용되어진 T 림프구는 well 당 1×10^6 세포를 사용하였으며, CO₂ incubator에서 3 일간 배양 후 CD4⁺ T 림프구를 antibody coated microbead로 분리 한 후, BrdU와 7-AAD를 T 림프구에 labeling 시 킨 후 유세포 분석기(flow cytometry)에 의해 각각의 세포 주기를 관찰하였음. 그 결과 <그림 3>에 서 보는 것과 같이 M1 추출물을 처리한 경우, 현저하게 S phase가 감소하는 것을 알 수 있었음. 이 후 T 림프구 세포 주기의 어떤 물질이 변화하는가를 측정하기 위해 특정 세포주기에 관여하는 물질들(cyclin A, CDK2, CDK4, p27)의 증감을 항체에 의한 Western blot analysis를 이용해 관찰하였음. 그 결과 M1 추출물이 p27의 발현을 증진 시켜, 세포 주기 상 S phase로 못 들어가게 하는 것으로 나타남<그림 4>.



< 그림 3 > M1 추출물이 세포주기에 미치는 영향 분석



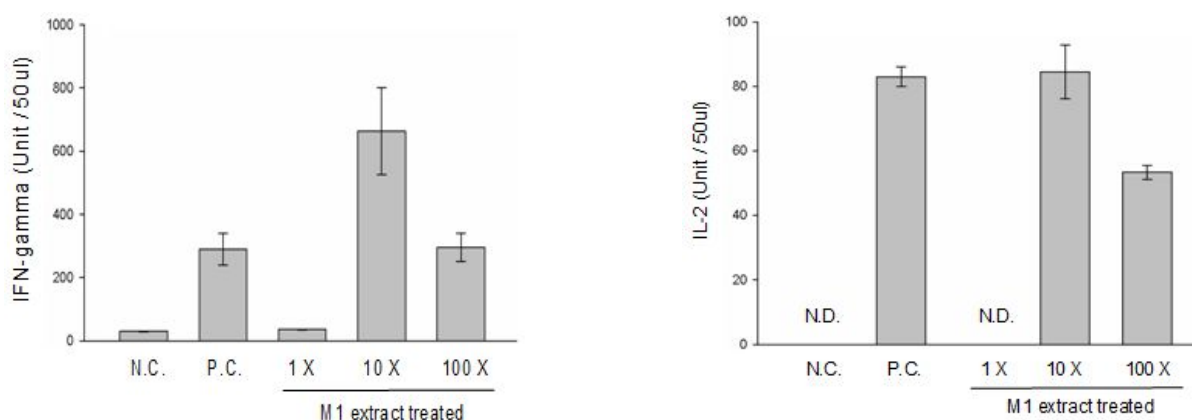
< 그림 4 > M1 추출물이 세포주기에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향 분석

2. 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석 및 동물 실험 모델 확립

1) 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석

돼지 정소-추출 스테로이드가 항원 특이적인 T 림프구에서 과생된 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향을 분석하기 위해 single TCR transgenic mouse인 OTII mouse의 비장 세포를 추출 후 주요 항원인 OVA peptide와 돼지 특이스테로이드를 처리한 후, 면역세포의 싸이토카인 분비능을 ELISA assay로 측정함. 이 때 사용되어진 비장 세포는 well 당 1×10^6 세포를 사용하였으며, OVA peptide는 well 당 10 ng을 사용하였음. 생쥐 비장 세포의 배양시 96 well plate를 사용했으며, CO₂ incubator에서 3일간 배양 후 세포배양액에서 ELISA assay 이용하여 IL-2와 IFN- γ 의 분비량을 측정하였음. 이 때 사용되어진 돼지 정소-추출 스테로이드는 M1 스테로이드이며, 호르몬의 조성은 표 1과 같음.

그 결과 그림 5와 같이 M1 추출물이 항원 특이적인 T 림프구에서 과생된 싸이토카인 (IFN- γ , IL-2)의 분비를 억제한다는 것을 밝혔음. 이러한 결과는 그림 2의 PMA (10 μ M) 와 ionomycin (10 ng)으로 자극한 후, 밝혀진 결과와 동일하며, 따라서 비특이적 (PMA + ionomycin) 또는 특이적 항원 (OVA peptide) 모두에게 M1 추출물이 T 림프구의 활성을 억제하는 것을 밝혀냄.



< 그림 5 > M1 추출물이 T 림프구의 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2) 분비에 끼치는 영향 분석.

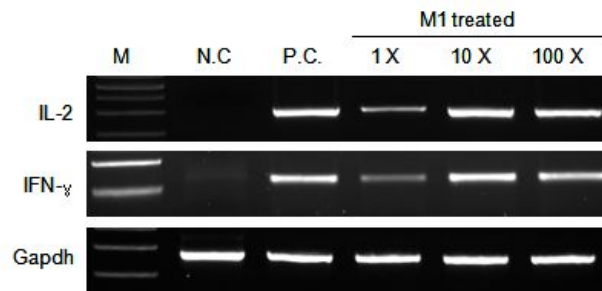
N.C.는 음성 대조구로 비장세포를 자극시키지 않은 상태이며, P.C.는 양성 대조구로 비장세포를 자극시킨 것임. 또한 1X는 M1 추출물을 0.1% 수준에서 처리한 것이며, 10X는 0.01% 수준에서 처리한 것임. 또한 100X는 0.001% 수준에서 처리한 것임.

그 후 M1 추출물이 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2)의 transcription level을 조절하는지 아니면 translation level을 조절하는지 알아보기 위해 RT-PCR을 실시하였음. 우선 OTII mouse의 비장세포를 추출 후 주요 항원인 OVA peptide와 돼지 특이스테로이드를 처리한 후, 면역세포에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였음. 이 때 사용되어진 RT-PCR의 primer들은 <표 2>와 같음.

< 표 2 > RT-PCR에 사용되어진 primer의 sequence, GenBank number와 PCR product size

Gene		Sequence	Size	GenBank accession number
IFN- γ	forward	CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC ACT GC	433 bp	NM_008337.2
	reverse	AAC AGC TGG TGG ACC ACT CGG AT		
IL-2	forward	TGG AGC AGC TGT TGA	308 bp	NM.008366.2
	reverse	CAC CAC AGT TGC TGA		
t-bet	forward	CAG ATG ATC GTC CTG CAG TCT CTC CAC AA	393 bp	NM_019507.1
	reverse	CCA GTA AGG CTG TGA GAT CAT ATC CTT GG		
Gapdh	forward	ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp	NM_008084.2
	reverse	CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG		

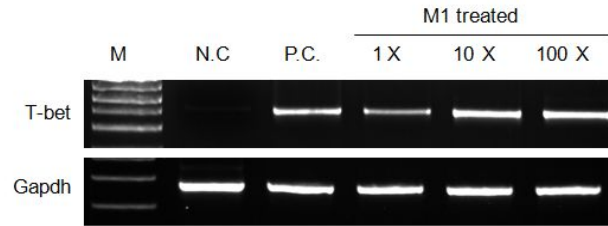
그 결과 <그림 6>과 같이 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2)의 mRNA를 감소시키는 것으로 보아 M1 추출물이 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2)의 transcription level을 억제 시키는 것으로 생각 됨.



< 그림 6 > M1 추출물이 T 림프구의 특정 cytokine (IFN- γ , IL-2)의 transcription을 억제함

M은 분자 마커를 나타내며 N.C.는 음성 대조구로 비장세포를 자극시키지 않은 상태임. P.C.는 양성 대조구로 비장세포를 자극 시킨 것임. 또한 1X는 M1 추출물을 0.1% 수준에서 처리한 것이며, 10X는 0.01% 수준에서 처리한 것임. 또한 100X는 0.001% 수준에서 처리한 것임.

그 후 IFN- γ 의 특정 전사인자인 t-bet의 발현양을 분석하기 위해 RT-PCR을 실시하였음. 우선 OTII mouse의 비장 세포를 추출 후 주요 항원인 OVA peptide와 돼지 특이스테로이드를 처리 한 후, 면역세포에서 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였음. 이 때 사용되어진 RT-PCR의 primer 들은 표2에 명시되어 있음. 그 결과 IFN- γ 의 특정 전사인자인 t-bet의 발현양이 감소함을 알 수 있었음. 따라서 M1 추출물이 IFN- γ 의 특정 전사인자인 t-bet의 발현양을 감소 시켜, 면역세포에서 IFN- γ 의 분비량을 감소시킴을 알 수 있었음 <그림 7>.

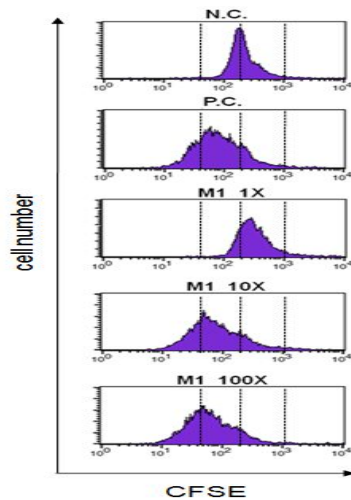


< 그림 7 > M1 추출물이 IFN- γ 의 특정 전사인자인 t-bet의 transcription을 억제함

M은 분자 마커를 나타내며 N.C.는 음성 대조구로 비장세포를 자극시키지 않은 상태임. P.C.는 양성 대조구로 비장세포를 자극 시킨 것임. 또한 1X는 M1 추출물을 0.1% 수준에서 처리한 것이며, 10X는 0.01% 수준에서 처리한 것임. 또한 100X는 0.001% 수준에서 처리한 것임.

IL-2 분비량의 감소는 M1 추출물이 p27의 발현양을 안정화시켜 세포 분열을 억제하는 것과 관련 있다고 생각되어짐. 따라서 IL-2 분비량과 세포 분열과의 상관관계를 알아보기 위해 OTII mouse의 비장 세포를 추출 후 주요 항원인 OVA peptide와 돼지 특이스테로이드를 처리한 후, CFSE labeling을 이용하여 면역 세포의 분열 정도를 측정하였음.

그 결과 그림 8에서 보는 것 같이 M1 추출물이 면역세포의 세포 분열을 억제하는 것으로 나타남. 따라서 IL-2 분비량의 감소는 T 림프구의 세포 분열이 억제됨으로 일어나는 것을 알 수 있었음.



<그림 8> M1 추출물이 T 림프구의 세포 분열을 억제함

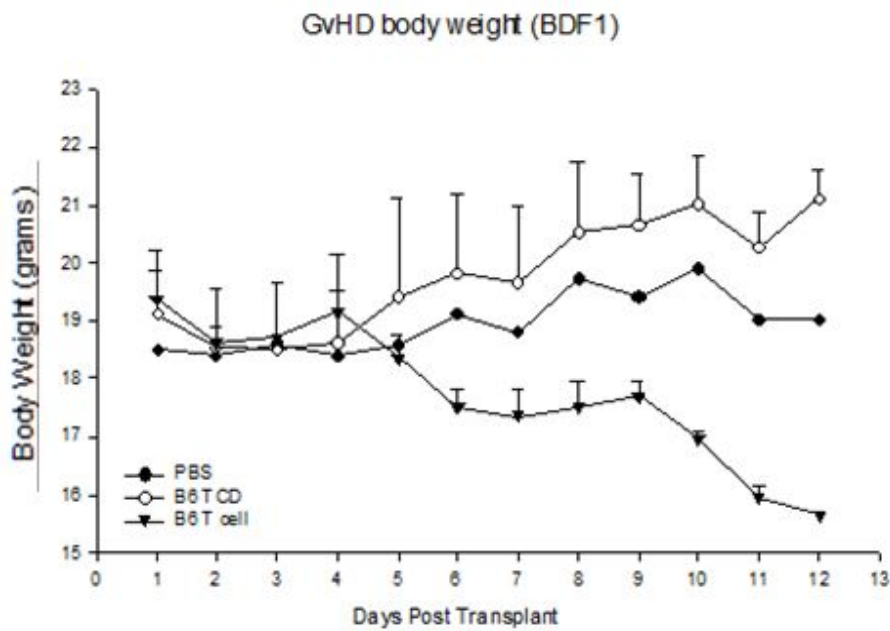
N.C.는 음성 대조구로 비장세포를 자극시키지 않은 상태임. P.C.는 양성 대조구로 비장세포를 자극 시킨 것임. 또한 1X는 M1 추출물을 0.1% 수준에서 처리한 것이며, 10X는 0.01% 수준에서 처리한 것임. 또한 100X는 0.001% 수준에서 처리한 것임.

2) 돼지 정소-추출 스테로이드를 이용한 면역치료 요법 개발을 위하여 GVHD (Graft versus host disease) 동물 모델 확립

장기 이식 거부 반응에서 급성 거부 반응은 주로 이식된 장기에서 유래한 수지상세포가 림프조직에서 직접 이종장기특이 T 림프구를 자극하는 경우와, 수여자의 수지상세포에 제시된 이종장기 유래 항원이 이종장기특이 T 림프구를 자극하는 경우의 두 가지로 나뉨. 결국

T 림프구의 효율적 제어에 따라서 거부 반응을 억제 할 수 있음.

M1 추출물의 효능은 T 림프구의 세포 분열 억제 및 주요 Th1 type 사이토카인인 IFN- γ 의 분비를 억제하는 것으로 밝혀짐. 따라서 면역치료 요법의 동물 모델을 이용하여 M1 추출물의 효능을 생체 내에서 검증하기 위해 이식 거부 반응의 특정 질환 동물 모델을 정립하였음. GVHD (Graft versus host disease) 동물 모델이란 이식 한 면역세포에 의해 이식 받은 개체의 장기를 손상시키는 대표적인 조직 거부 현상의 동물 모델임. 우선 B6 생쥐의 비장세포 중 T 림프구를 분리하여 2.5×10^6 세포를 방사선 조사 한 (900 rad) BDF1 생쥐에 꼬리 정맥 내 주사로 투여하고, 그 후 매일 비장세포를 받은 각 각의 BDF1 생쥐의 무게를 측정 함. 또한 GVHD에 대한 score를 측정하고 각 각의 면역 세포의 활성 정도를 측정 함. 이 때 음성 대조구는 비장세포 대신에 PBS를 투여한 것과 비장세포 에서 T 림프구를 제거한 세포를 사용 하였음. 그 결과 그림 9에서 보는 것 같이 음성 대조구인 비 장세포 대신에 PBS를 투여한 것과 비장세포에서 T 림프구를 제거한 세포를 투여한 것 보다, 비장 세포 내 T 림프구를 투여 한 것이 더 효과적인 면역 거부 현상을 일으켰음을 알 수 있음. 이러한 결과는 GVHD에 대한 면역 거부 현상도 T 림프구에 의존적 이라는 것을 실험적으로 입증한 것임.

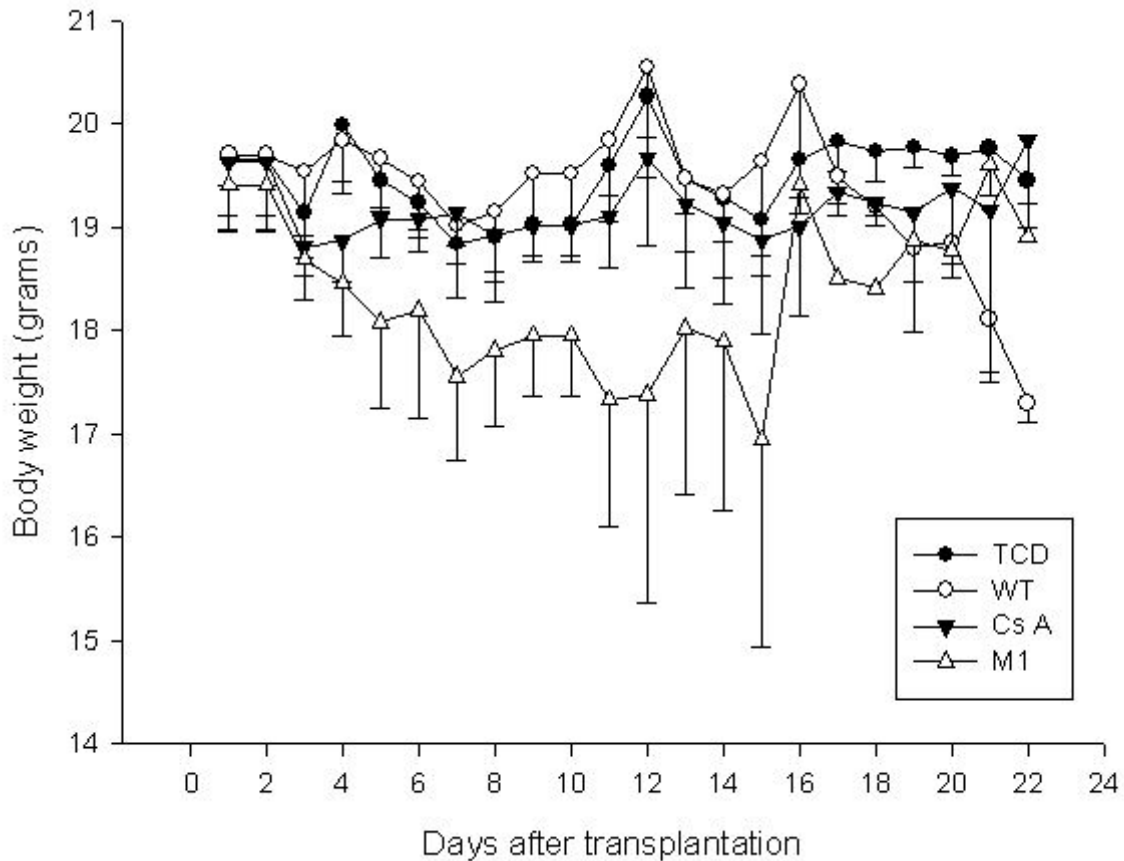


<그림 9> 면역 거부 현상에서 T 림프구의 중요성을 알아보기 위한 GVHD 동물 모델 확립.
 PBS를 투여함; B6 TCD, B6 비장세포 중 T 림프구를 제거한 비장세포를 투여함; B6 T cell, B6 생쥐의 비장세포 중 T 림프구를 분리하여 투여함.

3. 돼지 정소-추출 스테로이드 함유물질의 투여에 따른 Graft versus host disease (GVHD) 모델을 이용한 분석

M1 추출물의 효능을 GVHD 모델에서 분석하기 위해, 4 가지 실험군을 사용하였음. 우선 B6 생쥐의 비장세포 중 T 림프구를 분리하여 2.5×10^6 세포를 방사선 조사 한 (900 rad) BDF1 생쥐에 꼬리 정맥 내 주사로 투여하고, 그 후 매일 비장세포를 받은 각각의 BDF1 생쥐의 무게를 22일까지 측정하였음<그림 10>. 이 때 대조구로는 T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes) 과 대표적 면역억제제로 알려진 cyclosporine A를 투여 한 것을 사용하였음. 따라서 실험군은 M1 추출물 처리군, cyclosporine A 처리군, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes), 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것(WT)의 4 가지 군으로 나뉜. GVHD 22 일 후, recipient에 존재 하는 donor cell의 total cell number를 측정 하였으며<그림 11>, donor cell의 total T 림프구, $CD4^+$ (helper) T 림프구, $CD8^+$ (cytotoxic) T 림프구, B 림프구의 수를 측정하였음<그림 12, 그림 13, 그림 14, 표 3>. 또한 GVHD (Graft versus host disease) model에서 T 림프구의 활성을 측정하기 위해, GVHD 22일 후 recipient에 존재 하는 donor cell 중 T 림프구의 활성 정도를 측정하기 위해 CD44, CD62L, CD69 등의 세포표면 물질의 발현 정도를 유세포 분석기로 분석하였음<그림 15, 표 3>.

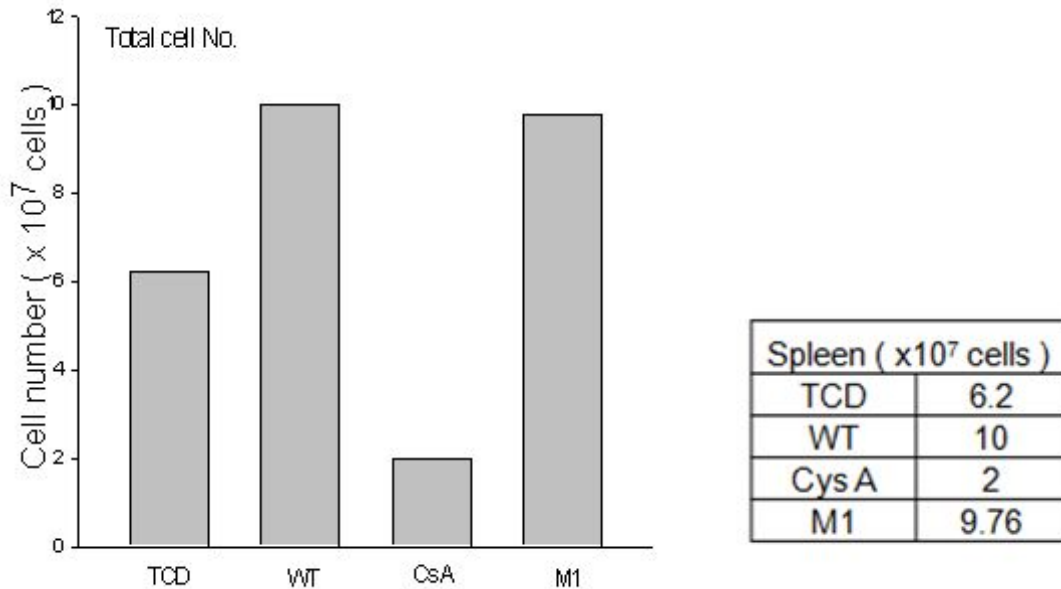
<그림 10>에서 보는 것 같이 M1 추출물을 처리한 실험군은 GVHD 22 일 후 cyclosporine A 처리군, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes)과 생쥐의 무게에서 별 다른 차이가 없음이 나타났음. 또한 M1 추출물을 처리한 실험군, cyclosporine A 처리군, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes)들의 생쥐 몸무게는 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것(WT)보다 몸무게가 정상적으로 돌아왔음. 이러한 결과로 미루어 봐 M1 추출물이 GVHD 모델에서 효과가 있는 것으로 관찰되었음.



< 그림 10 > GVHD 동물 모델에서 adoptive transfer 후 변화하는 생쥐의 몸무게 측정.

TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

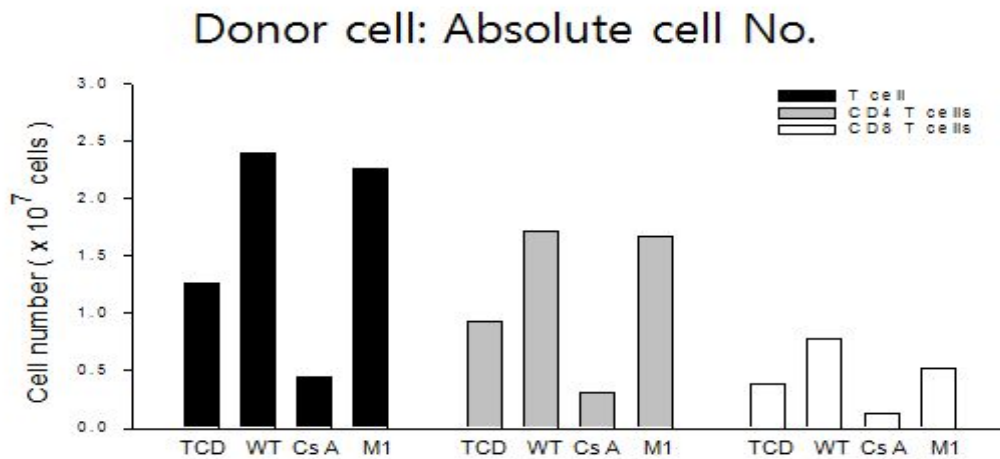
<그림 11>은 GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell의 total cell number를 측정한 그래프임. T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes)의 경우 세포 분열이 감소됨을 알 수 있었고, cyclosporine A 처리군 (Cs A)의 경우 림프구 독성이 있는 것을 알 수 있었음. M1 처리군의 경우, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것 (WT)과 비교하여 정상적인 donor cell의 숫자가 감지되었음.



< 그림 11 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell의 total cell number 측정.

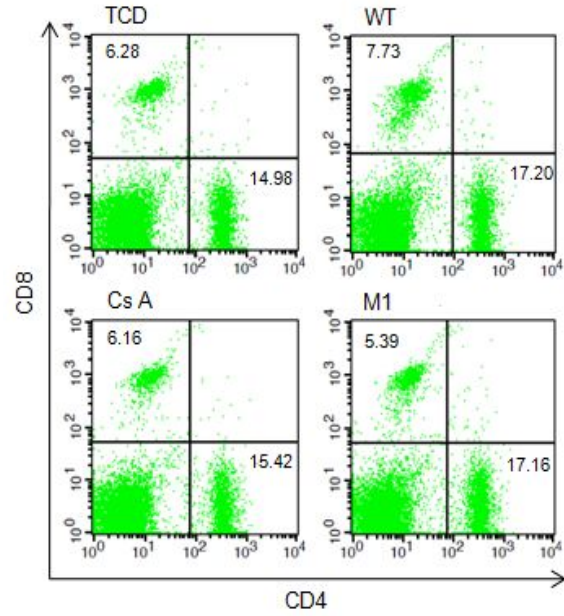
TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

<그림 12, 그림 13>은 GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell의 total T cell number, CD4⁺ T cell number, CD8⁺ T cell number를 측정 한 그래프임. T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes)의 경우, total T cell, CD4⁺ T cell, CD8⁺ T cell의 세포 분열이 감소됨을 알 수 있었고, cyclosporine A 처리군 (Cs A)의 경우 전체적인 T 림프구의 숫자가 감소하는 것을 알 수 있었음. M1 처리군의 경우, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것(WT)과 비교하여 정상적인 T 림프구의 숫자가 감지되었음.



< 그림 12 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 total T cell number, CD4⁺ T cell number, CD8⁺ T cell number 측정.

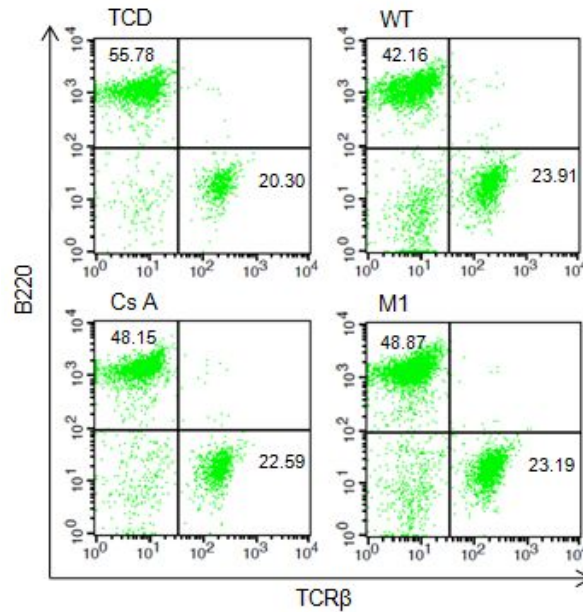
TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.



< 그림 13 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 CD4⁺ T cell과 CD8⁺ T cell을 유세포 분석기로 측정.

TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

<그림 14>는 GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell의 T cell과 B cell(B220⁺ cell)을 유세포 분석기로 분석 한 그림임. T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것(TCD; T cell depleted splenocytes)의 경우, 현저하게 B cell population이 증가한 것으로 나타남. 하지만 cyclosporine A 처리군 (Cs A), 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것(WT), M1 추출물을 처리한 것은 B cell population이 증가하지 않았음. 표 3은 donor cell의 각 각의 면역 세포의 total cell number (absolute cell number)를 나타냄.



< 그림 14 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 T cell과 B cell(B220⁺ cell)을 유세포 분석기로 측정.

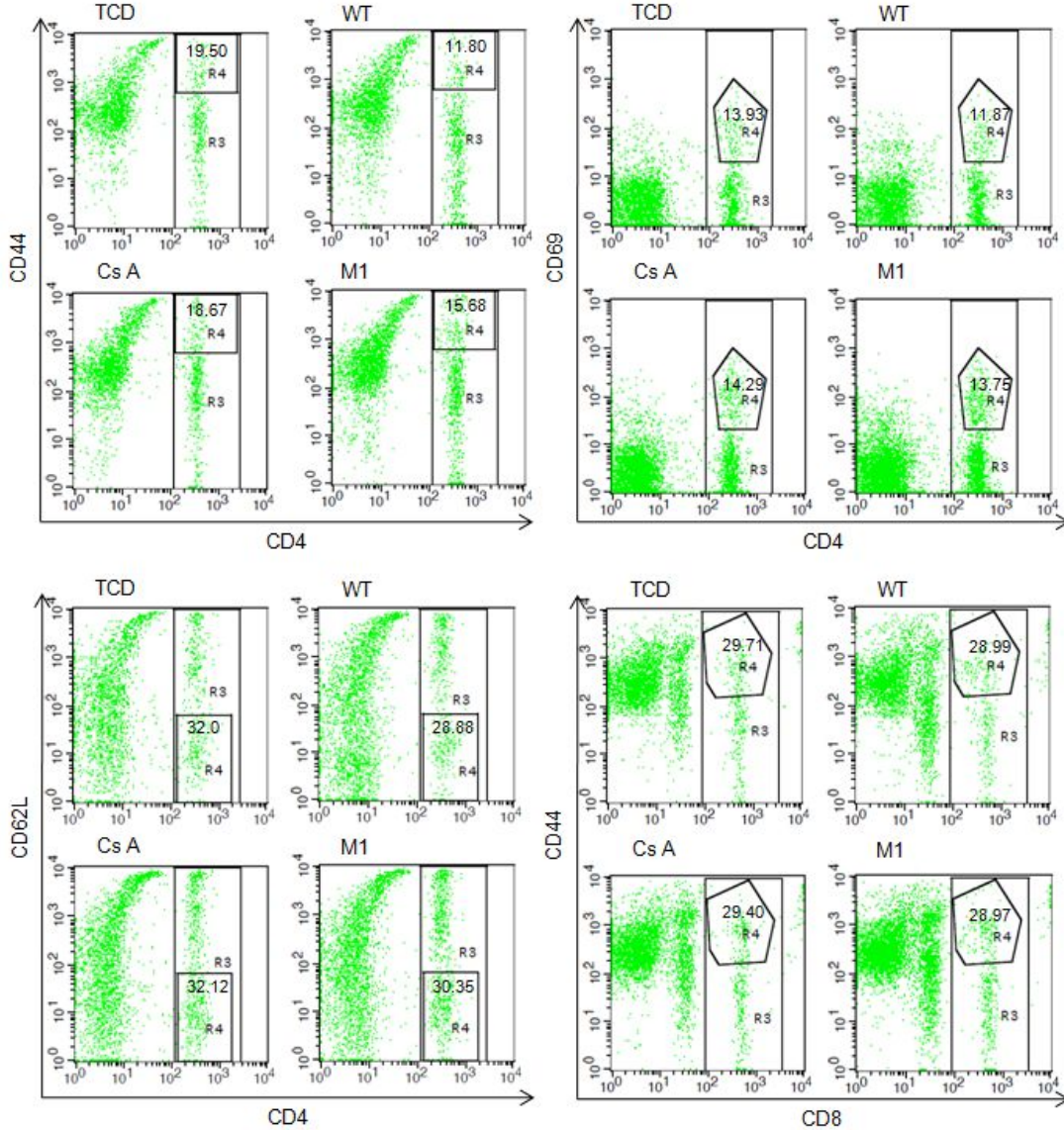
TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

Mouse			Gate %	Total %	Absolute cell No. (x10 ⁶)	
Donor	H2-kd negative gate	T cell	TCD	24.87	20.30	12.5860
			WT	30.89	23.91	23.9100
			Cs A	29.23	22.59	4.5180
			M1	29.37	23.19	22.6334
		B cell	TCD	68.34	55.78	34.5836
			WT	54.47	42.16	42.1600
			Cs A	62.31	48.15	9.6300
			M1	61.90	48.87	47.4039
		CD4 + T	TCD	17.92	14.98	9.2876
			WT	21.88	17.20	17.2000
			Cs A	18.98	15.42	3.0840
			M1	21.57	17.16	16.7482
		CD8 + T	TCD	7.51	6.28	3.8936
			WT	9.84	7.73	7.7300
			Cs A	7.58	6.16	1.2320
			M1	6.78	5.39	5.2606
	H2-Kd negative CD4 + T cell gate	CD44 high	TCD	19.50	3.26	2.0212
			WT	11.80	2.35	2.3500
			Cs A	18.67	2.97	0.5940
			M1	15.68	3.16	3.0842
		CD62L low	TCD	32.00	5.48	3.3976
			WT	28.88	3.68	3.6800
			Cs A	32.12	5.67	1.1340
			M1	30.35	5.64	5.5046
		CD69 high	TCD	13.93	2.59	1.6058
			WT	11.87	2.46	2.4600
			Cs A	14.29	3.10	0.6200
			M1	13.75	3.25	3.1720
	H2-Kd negative CD8 + T cell gate	CD44 high	TCD	29.71	2.57	1.5934
			WT	28.99	2.65	2.6500
			Cs A	29.40	2.62	0.5240
			M1	28.97	2.26	2.2058
CD62L low		TCD	6.09	0.36	0.2232	
		WT	27.30	2.75	2.7500	
		Cs A	6.95	0.57	0.1140	
		M1	11.91	0.87	0.8491	
CD69 high		TCD	6.65	0.49	0.3038	
		WT	19.80	2.05	2.0500	
		Cs A	5.88	0.55	0.1100	
		M1	7.68	0.57	0.5563	

< 표 3 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 각 각의 면역 세포의 total cell number (absolute cell number).

H2-kd negative gate, donor cell; TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

<그림 15>는 GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 T 림프구의 활성 정도를 측정하기 위해 CD44, CD62L, CD69 등의 세포표면 물질의 발현 정도를 유세포 분석기로 분석한 그림임. 활성화된 T 림프구인 CD44⁺, CD62L⁻, CD69⁺ T 림프구의 경우, 4 가지 실험군 모두 큰 차이가 없음을 알 수 있음.



< 그림 15 > GVHD 22일 후, recipient에 존재 하는 donor cell 중 T 림프구의 CD44, CD62L, CD69 등의 세포표면 물질의 발현 정도를 유세포 분석기로 분석.

TCD, T 림프구를 제거한 비장세포를 넣어 준 것 (T cell depleted splenocytes); WT, 정상 생쥐의 비장세포만을 넣어 준 것; Cs A, cyclosporine A 처리군; M1, M1 추출물을 처리한 실험군.

4. 종합적 소견

본 연구를 수행하는 동안 스테로이드의 추출 방법 및 정량화 방법 개발과 이러한 방법으로 추출된 스테로이드의 생리적 효과를 관찰하였다. 3년 이란 짧은 기간 동안의 연구결과로서는 흥미로운 많은 결과를 도출하였으나 일부 평가자의 의견처럼 연구결과가 상반되어 보이는 부분도 있다. 하지만 그러한 상반되어 보이는 연구결과가 스테로이드가 갖고 있는 특징이라고 알려져 있기 때문에 그다지 놀라운 사실은 아니라고 사료된다. 따라서 보고서에 기술한 본 연구의 결과 또한 흥미로운 결과라고 판단된다. 그러나 평가자의 지적처럼 추후 연구를 통해 이러한 상반된 결과가 나타나는 지에 대한 기전의 연구가 본 연구 결과의 산업화에 필요한 전제 조건이라고 사료된다.

제2협동과제 : 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘상피 발달에 미치는 영향 연구

1. 간세포 및 암컷 생쥐를 이용한 독성과 난소기능에 미치는 영향 연구

1) 간세포를 이용한 독성 분석

돼지 정소 추출-스테로이드가 체내에서 독성을 유발하는 가를 알아보기 위하여 운반체로 사용한 cotton seed oil을 주사하여 대조군으로 사용하였다. 다른 한편으로 본 추출물에

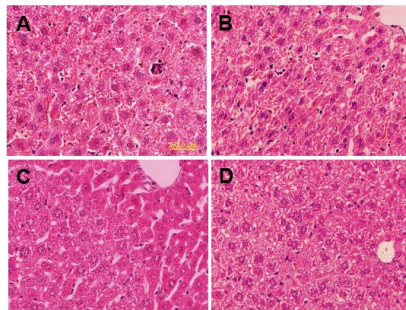


Fig. 1. Photomicrograph of liver after treatment of various kind of steroid hormonal extracts (M1 and M2). Cotton seed oil was used as vehicle and injected every day for 14 days. Nandrolone, M1 and M2 were injected (sc) every day for 14 day (6 mice per group). Necrosis in liver cells were very rear in all groups. The livers were embedded in paraffin and stained with H-E (400x). A; vehicle, B; nandrolone, C; 100% M1, D; 100% M2.

함유되어 있는 nandrolone에 의한 독성을 알아보기 위하여 3mg/kg/day로 처리하여 분석하였다. 또한 본 연구의 표적물질인 돼지 정소 추출-스테로이드로 공정방법에 따라 나눈 M1 그리고 M2를 농도별로 각각 14일간 매일 처리하였다(0.1%, 1%, 10%, 50%, 100%). 대조군과 모든 처리군에 각각 6 마리의 CD-1 생쥐를 사용하여 실험의 유용성을 확립하였다. 흥미롭게도 처리한 모든 군에서 간세포의 괴사가 대조군에서처럼 거의 발견되지 않았다. Fig. 1은 vehicle (Fig. 1A), nandrolone (Fig. 1B), 100% M1 (Fig. 1C), 100% M2 (Fig. 1D) 처리군에서 얻은 간 조직을 H-E 염색을 통하여 얻은 자료이다. Fig. 1에서 보듯이 세포 괴사가 모든 처리군에서 매우 희박함을 알 수 있다. 흥미로운 사실은 100%의 M1과 M2 처리군에서 간세포가 대조군과 동일하게 건강하다는 것이다.

처리농도에 따른 독성을 알아보기 위하여 M1을 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100% 농도로 생쥐에 피하 주사 하였다. 흥미롭게도 처리한 농도군 모두에서 간세포의 조직학적 소견으로 돼지 정소-추출 호르몬의 독성 효과가 나타나지 않았다 <그림 1-1>.

획득 방법을 달리하여 준비된 M2의 처리농도에 따른 독성을 알아보기 위하여 M2를 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100% 농도로 생쥐에 피하 주사하였다. 흥미롭게도 처리한 농도군 모두에서 M1군 에서처럼 간세포의 조직학적 소견으로 돼지 정소-추출호르몬의 독성 효과가 나타나지 않았다 <그림 1-2>.

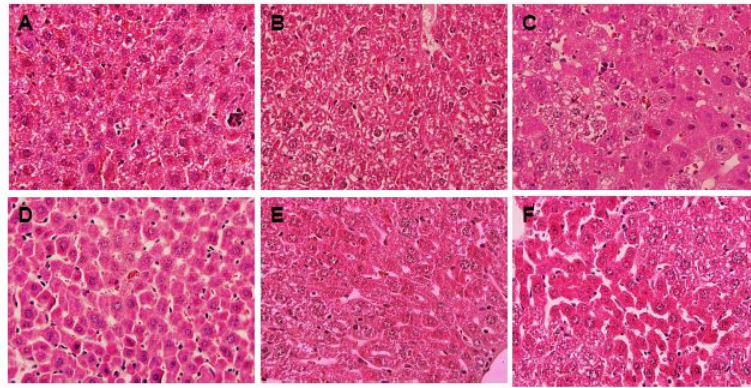


Fig. 1-1. Photomicrograph of liver after treatment of M1. Cotton seed oil and M1 were injected subcutaneously every day for 14 days (6 mice per group). The livers were embedded in paraffin and stained with H-E (400x). Necropsis in liver cells were very rear in all groups.. A; vehicle, B; 0.1% M1, C; 1% M1, D; 10% M1, E; 50% M1, F; 100% M1.

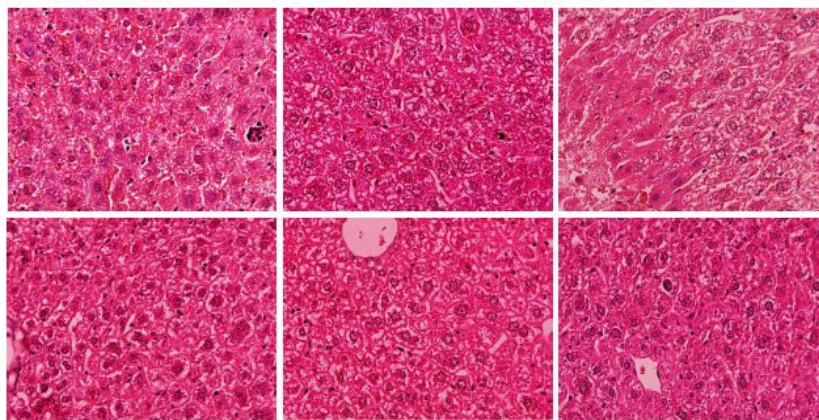


Fig. 1-2. Photomicrograph of liver after treatment of M2. Cotton seed oil and M2 were injected every day for 14 days (6 mice per group). Necropsis in liver cells were very rear in all groups. M2 or vehicle administered mice were fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin and stained with H-E (400x). A; vehicle, B; 0.1% M2, C; 1% M2, D; 10% M2, E; 50% M2, F; 100% M2.

2) 발정주기에 미치는 영향 (생식주기)

Vehicle을 처리한 대조군에서는 발정주기가 3-5일로 일정한 양상을 유지하였다. 돼지 정소 추출-스테로이드 호르몬에 대한 기능적 대조군으로 합성된 nandrolone을 투여한 군에서는 질 액 내 상피세포의 수적 증감에서는 주기성을 가지는 경향성이 있으나 발정기(estrus stage)로 분류할 수 있을 정도로 상피세포의 상대적 비가 높지 않았다<그림 2 B>. 다른 한편 돼지 정소 추출물인 M1을 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100%로 농도를 달리하여 처리하였을 때 농도군 간의 경향성에 있어서는 근소한 차이를 보였다<그림 2 C, D, E, F, G>. 경향성은 주기성을 유지하려는 경향성이 커서 nandrolone과는 달리 발정기로 분류할 수 있는 기준까지 상피세포의 상대적 비가 증가 하였다. M2를 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100% 농도로 처리할 경우 한 군에서는 농도별 차이는 있었으나 주기성 유지하려는 경향성은 vehicle처리군인 대조군,

nandrolone, M1 처리군과 유사 하였다. 상피세포의 상대적 비율은 그 농도에 따른 다양한 변화양상을 보였으나 nandrolone 처리군과는 달리 상피세포의 상대적 비율이 vehicle군에서처럼 나타났다.

이러한 결과를 통하여 본 연구의 중심 물질인 돼지 정소 추출-스테로이드 호르몬은 발정 주기의 주기성을 유지하려는 생리적 경향성을 억제하지 않는 것을 알 수 있다. 따라서 발정기가 발정주기 동안에 도래하여 배란이 진행됨을 예측할 수 있다.

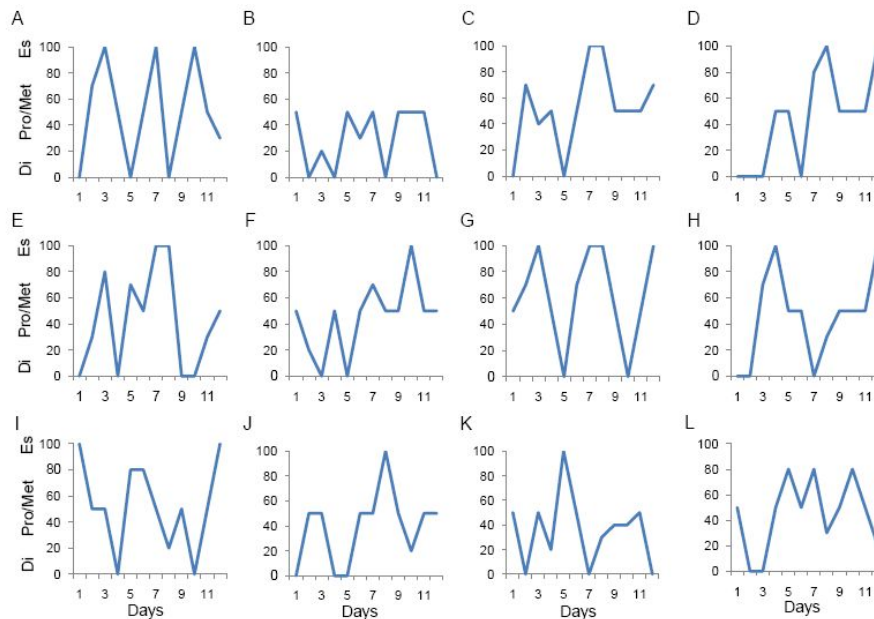


Fig. 2. Patterns of Estrus cycle in control (A), nondrolone (B), M1(C-G) and M2(H-E). Estrus cycle was analyzed by the daily vaginal smear (for 12 days). Periodicity of estrus cycle was severely disturbed by the nandrolone. M1 and M2 showed disturbing effects and it is not dependent on those dosage (0.1%; C and H, 1%; D and I, 10%; E and J, 50%; F and K, 100%; G and L.

3) 배란에 미치는 영향

배란주기에 미치는 영향에서 주기적 경향성이 유지되고 또한 배란기가 관찰되었다. 그러나 돼지 정소 추출-스테로이드에 에스트로젠과 같은 여성호르몬이 있어 질 상피의 활성화에 영향을 줄 수 있다. 따라서 난소에서 유래한 에스트로젠에 의한 직접적 조절의 결과가 아닐 수 있어 정소 추출-스테로이드를 처리한 생쥐 난소의 생식소자극호르몬에 대한 반응성을 통하여 난소의 기능이 온전한지 여부를 확인하였다. 14/10 광주기가 유지되고 물과 먹이가 충분히 공급되는 사육 환경에서 사육한 6주된 생쥐에 정소 추출-스테로이드를 14일간 주사 후 12 - 14시에 5 IU PMSG를 주사하고 48시간 후에 5 IU hCG를 주사하여 과배란을 유도하였다. hCG 주사 후 15시간에 생쥐를 희생하여 배란된 난자의 수를 계수하였다. M1과 M2가 스테로이드이기 때문에 농도 의존적 생리 현상이 있을 수 있으나 배란과 관련된 반응성 연구에서는 100% 농도군을 사용하여 그 반응성을 알아보았다. 대조군에서 약 42개의 난자가 배란되었고 M1과 M2군에서도 통계적 유의성 없이 난자가 배란되었다 <그림 3>.

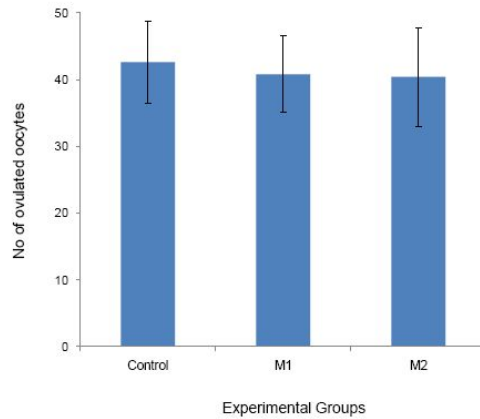


Fig. 3. Effects of extracts on the response of ovary to the gonadotropins. Mice which were primed with vehicle, M1 and M2 were induced ovulation using superovulation methodology. Mice were sacrifice at 15 hr after hCG injection.

4) 임신유지

정소 추출-스테로이드를 임신한 생쥐에 임신8일째부터 주사하여 임신 유지에 미치는 영향을 알아보았다. 스테로이드 농도별 반응성을 고려하여 10%, 50%, 100% 농도군으로 하여 임신 유지의 성공률을 알아보았다. 임신유지의 성공 여부는 임신 18 - 19일째 자궁에서 관찰하였다. <Fig. 4>에서 보듯이 이를 반복적으로 실험하고 있으며 이를 이용하여 2차년도 내용의 일부인 F1세대의 세대간 변이 여부를 난소의 반응 측면에서 확인 중에 있다.

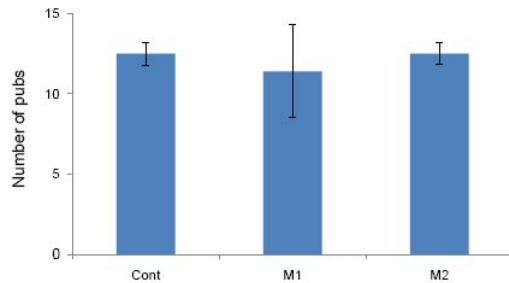


Fig. 4. The number of pups in the control and experiment groups after administration of vehicle and extracts. During pregnancy the extracts were administered for 14 days and checked the nuber of pups.

일차년도에는 돼지 정소 추출-스테로이드 정제 방법에 따라 수확한 제품이 암컷 생쥐의 in vivo 상황에서 처리 농도에 따른 독성을 nandrolone, vehicle 처리군과 상대비교를 하였다. 결론적으로 돼지 정소 추출-스테로이드 정제 방법에 따른 제품은 그 사용농도에 관계없이 본 연구에서는 독성이 없는 것으로 분석되었다. 다른 한편으로 이들 스테로이드 제제를 암컷에 처리하였을 때 나타날 수 있는 남성화 가능성을 알아보기 위하여 난소의 기능에 대한 분석을 1) 배란(발정)주기, 2) 생식소자극호르몬에 대한 반응정도, 3) 임신유지를 통하여 시도하였다. 흥미롭게도 estrus cycle에서 주기성을 유지하는 경향이 있으며, 배란 자극에 의하여 배란이 성공적으로 진행됨을 확인할 수 있었다. 다른 한편 임신한 암컷 생쥐에 처리하였을 경우 임신유지에 영향이 없음을 알 수 있었다.

따라서 1차년동의 연구 목표가 성공적으로 달성되었다고 자체 평가한다. 다른 한편으로 본 연구 과제에서 추구하고 있는 돼지 정소 추출-스테로이드의 산업적 이용이라는 목적에 한발 다가갔음을 이야기하고 싶다. 즉 본 실험 결과를 통하여 돼지정소추출물이 독성 없이 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 난소의 기능이나 임신유지에 있어 별다른 영향이 없는 것을 통하여 폐경기 이후의 여성은 물론이고 가임기 여성에게도 사용할 수 있을 것으로 추정된다. 이는 본 과제에서 사용하고 있는 제제가 남성화를 촉진하지 않는다는 잠정적 결과를 얻을 수 있었으며 이의 보완과 약제로서의 효능이 2차 년도 및 3차 년도를 통하여 진행될 것이다.

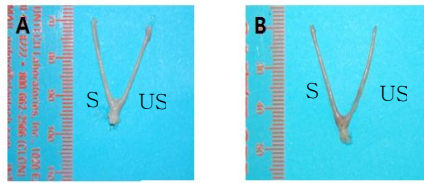
2. 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향 연구

1) 탈락막 반응에 미치는 영향

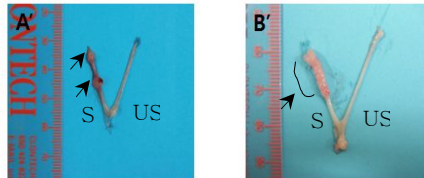
탈락막 반응을 유도하기 위하여 난소를 제거하였다. 대조군으로는 vehicle을 난소제거 후 지속적으로 2주 주사하고 에스트로겐을 사흘동안 주사(1회/일)하고 이틀 동안 쉬고 다시 에스트로겐과 프로그스테론을 매일 주사하면서 3일째 되는 날 탈락막 반응 유도를 위하여 신호를 주었다. 이후 매일 에스트로겐과 프로그스테론을 주사하면서 유도 후 0시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간대에 생쥐를 희생하고 자궁을 적출하였다. 한편 돼지 정소-추출-스테로이드 호르몬 복합물이 탈락막 반응 즉 착상에 미치는 영향을 분석하기 위하여 난소를 제거한 후 매일 정소-추출-스테로이드 호르몬 복합물을 주사하고 동일한 방법으로 탈락막 반응을 유도하였다. 탈락막 반응을 유도하는 과정에도 지속적으로 정소-추출-스테로이드 호르몬 복합물을 주사하였다. 자궁을 적출한 후 탈락막 반응이 유도되었는지 여부를 육안으로 확인하고 특정 유전자 발현 분석을 위하여 일부를 액체질소에 얼리고 일부는 조직학적 분석을 위하여 4% paraformaldehyde용액에 고정하였다.

흥미롭게도 탈락막 반응이 정소-추출 스테로이드 호르몬 복합물을 투여한 군과 대조군 모두에서 관찰되었다. 반응 정도에 있어서도 대조군과 정소-추출 스테로이드 호르몬 복합물 처리군 간에 차이가 없었다<그림 1>.

0 hr



96 hr

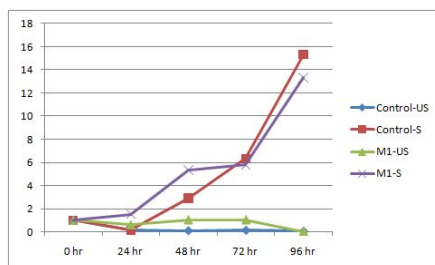


< 그림 1 > Photograph of artificially decidualized uterus in control and porcine-testis-derived-steroid-hormones-complex. A and A' showed the control; B and B' showed the 0.1% M1. Arrow means the decidualized uterine area. S, stimulated horn; US, unstimulated horn.

2) 탈락막 반응 진행과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

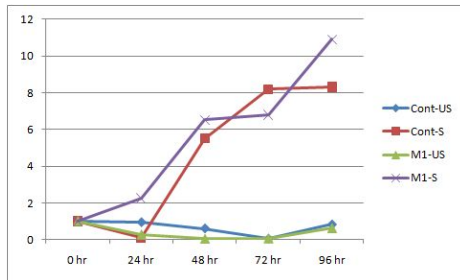
위의 결과에서 알 수 있듯이 돼지 정소-추출-스테로이드 호르몬 복합물이 착상에 즉 탈락막 반응을 유발하는데 부정적 영향이 없음을 해부학적으로 알 수 있었다. 이러한 형태학적 변화는 이것을 구성하는 세포들의 활성화 결과로서 탈락막 반응이 진행되는 동안 발현되는 것으로 알려진 유전자들의 활성화 정도에 따라 그 성향이 달라진다. 따라서 이러한 유전자들의 활성이 대조군과 차이가 있는지 또는 없는지를 확인하는 것은 정 반응 정도를 분석하는데 필요하다.

이를 위하여 quantitative real time RT-PCR 방법을 이용하여 탈락막 세포 표식자로 사용되는 alkaline phosphatase, 탈락막 세포 특이적으로 발현되는 cytotoxic T-lymphocyte antigen 2 beta, connexin 43의 발현 변화를 분석하였다. Alkaline phosphatase mRNA의 발현은 탈락막 반응을 유발하기 위하여 자극을 준 자궁각에서 대조군과 실험군 모두에서 유사한 양상으로 발현이 점진적으로 증가하였다<그림 2>.



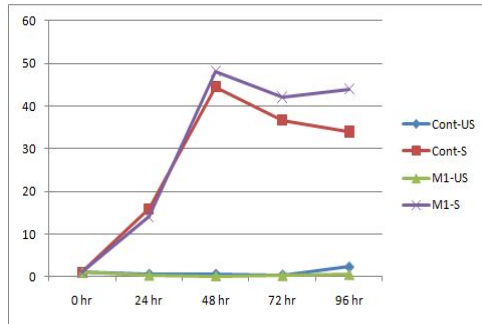
<그림2> Expression profile of alkaline phosphatase mRNA during decidualization in 0.1% M1 administered mice.

Cytotoxic T-lymphocyte antigen 2 beta mRNA의 발현 양상은 72시간까지 유사한 양상을 보였으며 96시간대에서 실험군에서 상대적으로 높은 경향을 보였다<그림 3>.



< 그림 3 > Expression profile of cytotoxic T-lymphocyte antigen 2 beta mRNA during decidualization in 0.1% M1 administered mice.

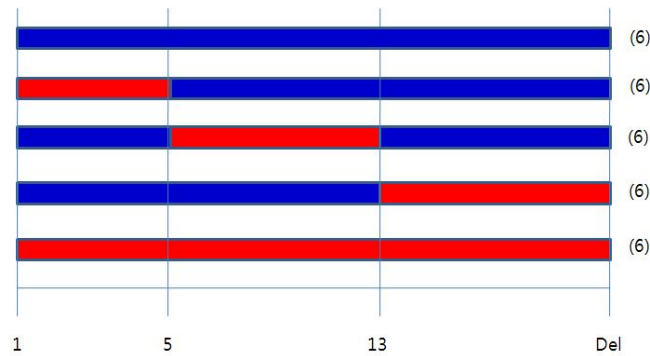
Connexin 43 mRNA의 발현 양상은 alkaline phosphatase mRNA의 발현과 유사하게 대조군과 0.1% M1을 투여한 실험군간 유의한 차이가 없이 상호 유사한 증감 유형을 보였다 < 그림 4 >.



< 그림 4 > Expression profile of connexin 43 mRNA during decidualization in 0.1% M1 administered mice.

3) 착상전후 배 발생에 미치는 영향

돼지 정소 추출 스테로이드 복합물이 착상전후 배아의 발생에 미치는 영향을 기형 유발율과 정상 태아 출산을 기준으로 분석하였다. <그림 3>에서 보듯이 5개의 그룹으로 나누어 실험을 수행하였다. 대조군으로 임신 첫날부터 분만할 때 까지 vehicle을 주입한 대조군, 임신 1일 부터 5일까지 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물을 처리한 군, 임신 5일부터 13일까지 돼지 정소 추출스테로이드 복합물을 처리한 군, 임신 14일 부터 분만 때 까지 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물을 처리한 군으로 하여 각 군에서 기형으로 태어난 새끼수와 정상 새끼수를 비교 분석하였다<그림 5>. 한편 absorption 가능성을 분석하기 위하여 임신 기간 중에 희생하여 자궁 내 착상한 새끼수를 비교 분석하였다.



< 그림 5 >The schematic diagram for of porcine-testis-derived-steroid-hormones-complex. Blue colour means the vehicle administration and red colour means the porcine testis derived steroid hormone complex

<표 1>에서 보듯이 대조군과 실험군 들 간에 유산율의 차이가 없었다. 또한 태어나는 새끼수도 실험군간 차이가 없었다.

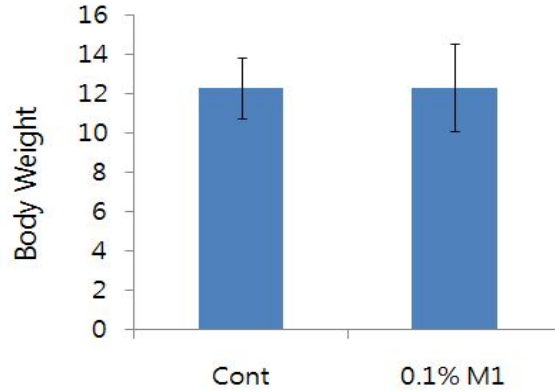
< 표 1 > The abortion rate

Groups	Cont	Exp
	Abortion rate (%)	Abortion rate (%)
Control	1.42 (1/ 70)	-
Group 1	0.00 (0 / 68)	1.49 (1 / 67)
Group 2	1.23 (1 / 81)	1.35 (1 / 74)
Group 3	0.00 (0 / 70)	0.00 (0 / 65)
Group 4	1.42 (1 / 70)	1.47 (1 / 68)

There was no significant difference between the groups.

4) 수유 능력에 미치는 영향

젖샘의 분화는 에스트로겐과 프로제스테론의 상호적 조절에 의하여 진행되며 수유를 가능하게 한다. 따라서 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물이 젖샘 분화에 영향을 줄 수 있어 분만 후 수유 능력에 미치는 영향을 태어난 후 14일 지난 새끼들의 몸무게를 측정하여 간접적으로 알아보았다(한배 새끼수는 그룹간 차이가 통계적으로 유의한 차이가 없음).



< 그림 6 > The body weights of 14 days old mice. The data showed average \pm SD.

대조군과 0.1% M1 처리 모에서 태어난 새끼간의 몸무게는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다<그림 6>. 돼지 정소 추출-스테로이드 복합물이 유산의 원인이 되지 않는 것처럼 젖샘에서의 젖 분비에 부정적 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

5) 종양 젖샘 상피세포의 증식에 미치는 영향

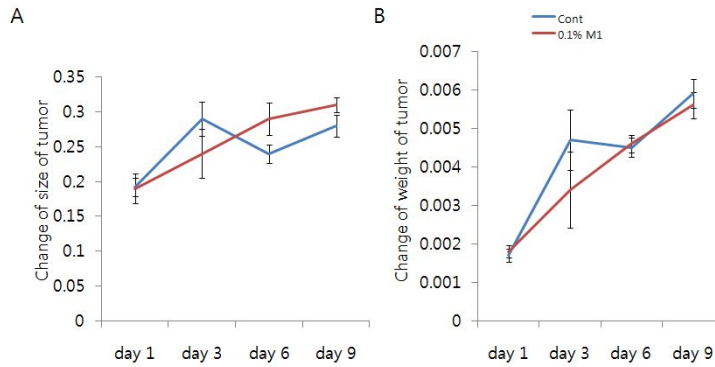
유방암의 대부분은 에스트로겐 의존성인 것으로 알려져 있으며 이후 비 의존적인 상태로 변화할 수 있음이 알려져 있다. 종양 초기의 많은 경우가 에스트로겐 의존적이다. 따라서 에스트로겐을 함유한 돼지 정소 추출-스테로이드 복합물은 잠재적인 종양세포 증식 촉진제로서 역할을 할 수 있다. 따라서 이에 대한 사전 분석이 없으면 돼지 정소 추출-스테로이드 복합물로 개발된 제품을 복용한 여성에게는 큰 위험 요소가 될 수 있다.

ZR-75-1 cell (2×10^6 cells)을 50% Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA)과 함께 Nude mice (Balb/cAJcl-nu) 피하에 이식하고 돼지 정소 추출-스테로이드 복합물을 <그림 7> 처럼 처리하면서 3일, 6일 9일 각각 이식된 세포군의 크기와 무게를 측정하였다.



< 그림 7 > Schematic diagram of experiment. Ovariectomy were did and after 2 weeks the cancer cell were transplanted in subcutaneous of Balb/cAJcl-nu mice. The size and weight of the transplanted cell bodies were measured at 3, 6, and 9 day.

흥미롭고도 고무적으로 대조군과 돼지 정소 추출-스테로이드 복합물을 투여한 실험군간 이식된 암세포군간 그 크기와 무게에 유의한 차이가 없었다<그림 8>. 이러한 결과는 돼지 정소에서 추출한 스테로이드 호르몬 복합물이 종양 젖샘 상피 세포의 증식을 촉진 하지 않는다는 것을 보이고 있다.



< 그림 8 > The changes of size and weight of the transplanted cancer cells in porcine-testis-derived-steroid- hormones-complex.

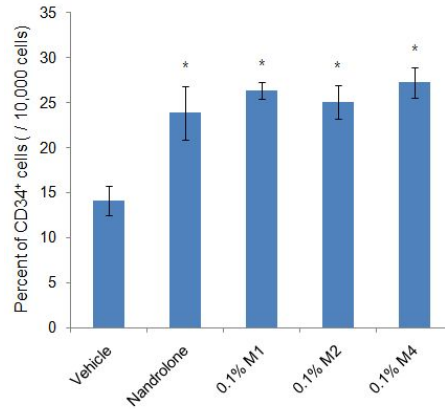
3. 골수 내 조혈 줄기세포의 증식, 적혈구 수의 변화, 혈액 성상에 미치는 영향 연구

다음으로 정소유래 steroid 복합물이 빈혈치료제로서의 가능성이 있는지를 알아보았다. 14 일 동안 정소유래 steroid 복합물을 처리한 후 말초혈액을 채혈하고 이후 대퇴골에서 골수세포를 획득하였다. 이후 혈액 조성을 분석하였고, 골수세포 내 CD34+인 세포의 비율을 구하였다.

1) 조혈 줄기 세포의 증식에 미치는 영향

돼지 정소-추출-스테로이드 복합물이 빈혈을 치료할 수 있는 제제로 사용할 수 있는 가를 알아보려고 각각 M1, M2, M4로 명명된 돼지 정소-추출-스테로이드를 이전 실험에 사용하였던 0.1% 농도 14일 동안 매일 0.1 ml 피하주사 방법으로 투여하였다. 대조군으로는 vehicle 처리군, 빈혈 치료 효과가 있음이 밝혀진 nandrolone 처리군으로 하여 동일한 기간 동안 처리하였다. 각 군에 적어도 18 마리 이상의 CD-1 암컷을 사용하였다. 이후 희생하여 대퇴골을 적출하였고, 식염수를 이용하여 골수를 관류하여 골수 세포를 획득하였다. 이후 이들 세포를 methanol로 고정하고, anti-mouse CD34 antibody로 표지된 세포를 FACS를 이용하여 계수하였다.

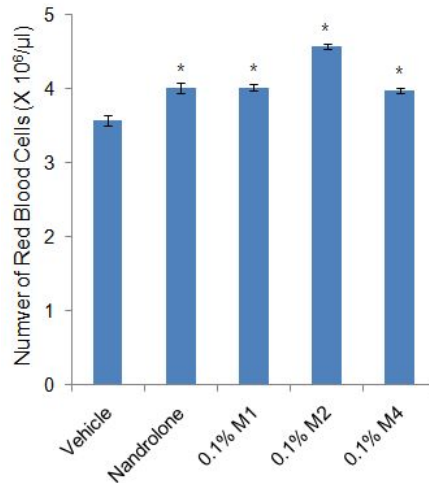
Vehicle을 처리한 대조군에서 조혈줄기세포로 인지되는 세포가 차지하는 비율은 평균 14.11%였다. 빈혈치료제로 사용되고 있는 nandrolone은 예상한 것처럼 평균 23.83%로 vehicle에 비하여 통계적으로 유의하게 증가하였다. M1, M2, M4를 0.1% 농도로 처리한 군에서는 (각각 평균, 26.31, 25.09, 27.22) 모두 vehicle 대조군에 비하여 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다. 더욱 흥미로운 사실은 통계적 유의성은 없으나 nandrolone에 비하여 M1, M2, M4 군에서 조혈줄기세포의 비율일 높은 경향성을 보인다는 것이다<그림1>.



< 그림 1 > The ratio of hematopoietic stem cells in the bone marrow of femur. CD34+ cells were counted with FACS. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean±SD. * P < 0.05 vehicle vs experimental group.

2) 적혈구 수 및 헤모글로빈 양 증가에 미치는 영향 연구

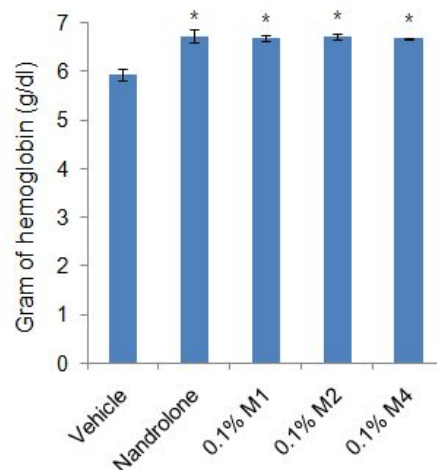
돼지 정소 추출 스테로이드 복합물이 빈혈을 치료할 수 있는 제제로 사용할 수 있는가를 알아보려고 M1, M2, M4를 이전 실험에 사용하였던 0.1% 농도 14일 동안 매일 0.1 ml 피하 주사 방법으로 투여하였다. 대조군으로는 vehicle 처리군, 빈혈 치료 효과가 있음이 밝혀진 nandrolone 처리군으로 하여 동일한 기간 동안 처리하였다. 각 군에 적어도 18 마리 이상의 CD-1 암컷을 사용하였다. Ether로 마취한 후 말초혈액을 채취하였다. 혈액을 채취할 때 혈액 응고나 기타 세포의 변형을 방지하기 위하여 EDTA를 처리하였으며, 바로 적혈구 수를 계수하고 헤모글로빈의 양을 분석하였다. 빈혈제로 사용되는 nandrolone은 말초 혈액 내 적혈구의 수를 증가시켰다. 적혈구 수가 통계적으로 유의하게 증가하였다.



< 그림 2 > The numbers of red blood cell (RBC) in peripheral blood. Ms had positive effects on the increase of the numbers of RBC. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean±SD. * P < 0.05 vehicle vs experimental group.

조혈줄기세포의 증가 결과와 일치하게 M1, M2, M4 모두에서 적혈구 수가 통계적으로 유의하게 증가하는 결과를 얻었다<그림 2>.

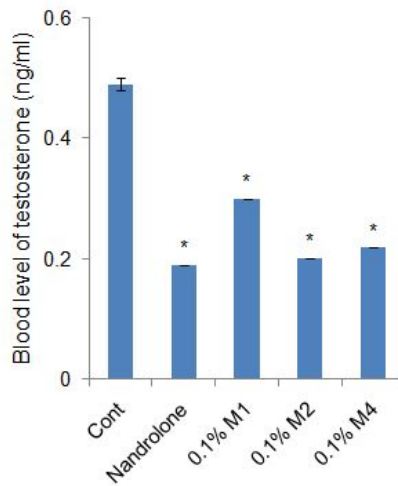
적혈구 수도 빈혈을 치료하는 빈혈 치료제로서 가치성을 판단하는 기준이 되나 또한 기능적 측면에서는 헤모글로빈의 양이 어느 정도 있는지를 분석하는 것이 중요하다. 따라서 적혈구 내 헤모글로빈의 양을 측정하였다. 흥미롭게도 헤모글로빈의 양도 적혈구 수에서처럼 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물에 의해 증가하는 것을 알 수 있었다<그림 3>. 이러한 결과는 일정 부피 내 적혈구 수의 증가에 의한 것 일 가능성이 있다.



< 그림 3 > The amount (g) of hemoglobin in peripheral blood. Ms had positive effects on the increase of the amount of hemoglobin. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean±SD. * P < 0.05 vehicle vs experimental group.

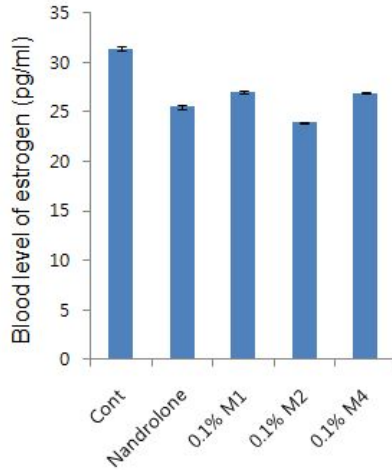
3) 혈중 스테로이드 양에 미치는 영향 연구

제제로 개발하고자 하는 것이 성 스테로이드이기 때문에 신체에서 negative feedback에 의하여 신체 내부에서의 호르몬 분비를 교란할 수 있다. 따라서 혈액 내 testosterone, 17β -estradiol, progesterone의 양의 RIA 방법을 이용하여 분석하였다. Testosterone의 양은 nandrolone 처리군에서 유의하게 감소하였다. 또한 M1, M2, M4에 의하여도 유의하게 감소하였다<그림4>. 이는 암컷에서 돼지 정소-추출-스테로이드 복합물 내 함유된 남성호르몬에 의한 영향으로 분석될 수 있다.



<그림 4> The levels of testosterone in the blood of the mice which were administered with Ms. The amounts of testosterone were measured with RIA method. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean±SD. * P < 0.05 vehicle vs experimental

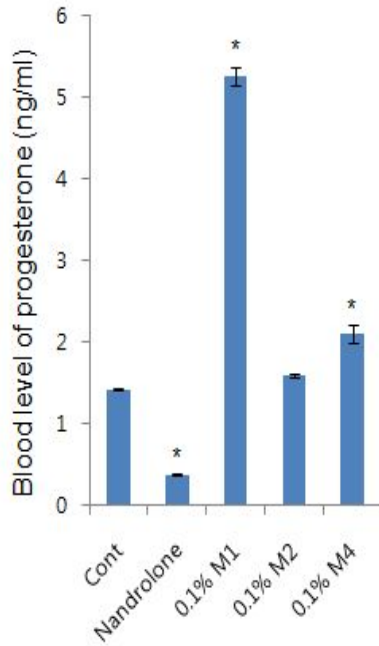
다른 한편으로 혈액 내 17β -estradiol의 양은 감소하는 경향이 있었으나 통계적 유의성은 없었다<그림 5>. Nandrolone 처리군에서도 17β -estradiol의 양의 변화는 통계적 유의성이 없었다.



< 그림 5 > The levels of 17β -estradiol in the blood of the mice which were administered with Ms. The amounts of 17β -estradiol were measured with RIA method. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean \pm SD. * $P < 0.05$ vehicle vs experimental group.

따라서 돼지 정소-추출-스테로이드 복합물 내 함유된 estrogen이 음성 되먹임 작용을크게 교란하고 있지 않은 것으로 분석된다.

다른 한편으로 progesterone의 양적 변화에서는 nandrolone 처리군에서는 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그러나 돼지 정소-추출-스테로이드 복합물 M1, M2, M4는 양적인 측면에서는 차이가 있었으나 혈액 내 progesterone의 양은 증가하였다<그림 6>.



< 그림 6 > The levels of progesterone in the blood of the mice which were administered with Ms. The amounts of progesterone were measured with RIA method. Experiments were repeated three times and 6 mice were used each group/repeat. The data were mean±SD. * P < 0.05 vehicle vs experimental group.

이러한 결과는 돼지 정소-추출-스테로이드 복합물이 신체 내에서 nandrolone과는 다른 생리적 조건을 형성하고 있음을 단적으로 보여주고 있는 것이다.

1차년도 및 2차년도 연구 성과에서 밝혔듯이 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물이 생식 능력에 큰 영향이 없다는 증거를 획득하였다.

이러한 결과를 종합해보면 돼지 정소-추출-스테로이드 복합물은 암컷의 신체 내에서 합성되는 스테로이드의 양적 변화를 크게 흔들지 않을 것이라는 것이다.

위의 결과를 종합하여 보면, 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물은 의학적으로 빈혈을 치료할 수 있는 제제로 사용될 수 있는 것으로 사료된다. 특히 지금까지 안드로겐이 빈혈에 매우 유용함에도 불구하고 그 부작용으로 인하여 사용이 매우 제한되어 있었다. 본 연구를 통하여 우리 연구에서 사용된 돼지 정소 추출 스테로이드 복합물이 그 대체 약으로 사용될 수 있음을 밝힐 수 있었다.

이러한 실험 결과는 돼지 정소유래 스테로이드 호르몬 복합물이 여성에게서 생식주기, 배란 등을 억제하거나 촉진하지 않는 조건에서 사용될 수 있는 조혈줄기세포 증식 촉진제로 사용될 수 있음을 의미한다. 즉 여성의 나이에 관계없이 사용될 수 있는 빈혈 치료제로 개발될 수 있음을 의미하는 것이다.

제3협동과제 : 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구

1. 흰쥐 지방세포와 간질세포 (Leydig cell)에 미치는 영향 및 독성 연구

1) 돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포주 (3T3-L1)의 증식과 분화에 미치는 영향 연구

미국 ATCC로부터 구매한 쥐 유래 지방세포주인 3T3-L1 세포주를 사용하여 주관 연구 책임자가 추출 방법에 따라 돼지 정소-추출 스테로이드의 4 종류를 지방세포에 서로 다른 농도로 투여한 후 6시간과 24시간 경과 후 지방세포의 증식 변화를 역광현미경 (inverted microscope)을 통해 육안으로 확인하였음.

10% FBS를 가지고 있는 DMEM 배지에서 배양되고 있던 지방세포에 처리한 4 종류의 돼지 정소-추출 스테로이드에 함유된 스테로이드의 양과 종류는 <표 1>에 기술되어 있음

< 표 1 > M1, M2, M3의 스테로이드 호르몬 조성

	M1	M2	M3	M4
Nandrolone	2.604($\mu\text{g/g}$)	3.190($\mu\text{g/g}$)	3.047($\mu\text{g/ml}$)	3224.01(ng/ml)
Testosterone	10.416($\mu\text{g/g}$)	13.742($\mu\text{g/g}$)	7.982($\mu\text{g/ml}$)	1527.76(ng/ml)
Androstenedione	325.08(ng/g)	318.94(ng/g)	146.94(ng/ml)	68.69(ng/ml)
Estradiol	547.18(ng/g)	543.64(ng/g)	186.27(ng/ml)	276.52(ng/ml)
Estrone	320.38(ng/g)	1094.16(ng/g)	591.83(ng/ml)	207.19(ng/ml)

예비연구에서 4 종류의 돼지 정소-추출 스테로이드를 각 종류의 최고 농도에서 지방세포에 처리한 후 2-3일 동안 관찰하였을 때 세포 형태 및 특별한 육안으로 변화 없이 자라는 것을 확인한 후 본 실험을 수행하였음.

돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 돼지 정소-추출 스테로이드는 ethanol을 용매로 녹인 후에, 지방세포를 약물처리하기 하루 전날에 starvation(DMEM with 0.5% FBS, antibiotics, Gibco, Invitrogen) 한 후, <표 2>에서 보이는 바와 같은 농도로 각 스테로이드 호르몬 (M1, M2, M3, M4)을 처리하였으며, 호르몬 처리 6시간과 24시간 뒤에 지방세포로부터 Total RNA isolation solution을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, UV spectrophotometer를 사용하여 추출된 total RNA의 농도를 측정하였고 agarose gel에서 RNA의 상태를 확인하였음.

< 표 2 > 지방세포에 투여한 돼지 정소-추출 스테로이드의 농도

돼지 정소-추출물	농도 1	농도 2	농도 3	농도 4
M1	1ug/ml	10ug/ml	50ug/ml	100ug/ml
M2	1ug/ml	50ug/ml	100ug/ml	200ug/ml
M3	1/100	1/10	1/2	원액
M4	1ug/ml	10ug/ml	100ug/ml	200ug/ml
대조군	ethanol ^a	ethanol ^a	ethanol ^a	ethanol ^a

ethanol^a : 각 돼지 정소-추출물의 농도에 따라 동량의 ethanol이 처리되었음

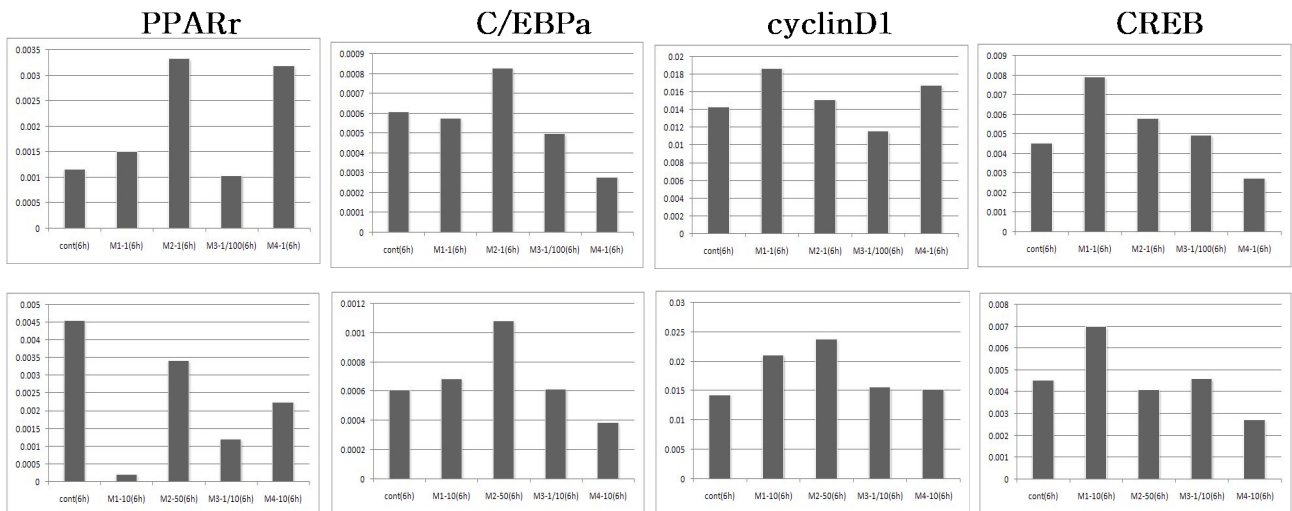
각 실험군의 지방세포로부터 추출된 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후 real-time PCR 기법을 사용하여 지방세포의 증식과 분화에 관련된 주요 유전자 4개 (PPAR gamma, C/EBP alpha, CREB1, cyclin D1)의 발현 양상을 비교, 분석하였음. Real-time PCR에서 internal control로써 GAPDH를 사용하였고, 또한 대조군 (ethanol 처리군)에서 각 유전자의 발현을 실험군과 비교함으로써 돼지 정소-추출 스테로이드의 농도별, 시간별 투여에 따른 유전자 발현 변화를 알아보았음.

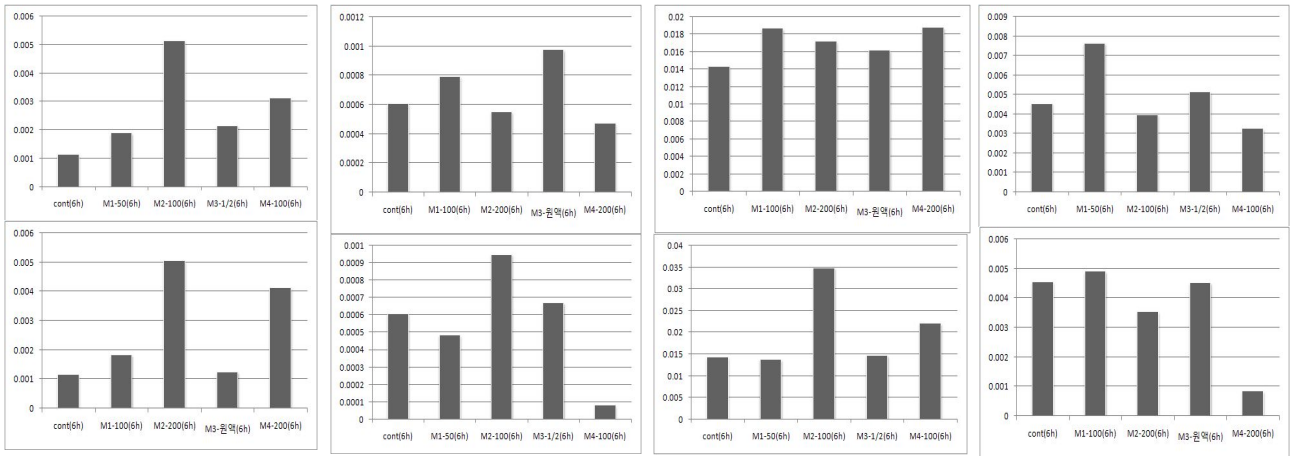
< 표 3 > Real-time PCR을 위해 사용된 primer sequence 및 T_m값

gene	sence	anti-sence	T _m (°C)
PPARgamma	5'-gatcatgaccaggaggagtc-3'	5'-gactctgggtcattcagctt-3'	53
C/EBPalpha	5'-agaagtcggtggacaagaac-3'	5'-cttgaccaaggagctctcag-3'	53
CREB1	5'-caaactagcagtgggcagta-3'	5'-gaatctgctgtccatcagtg-3'	55
cyclin D1	5'-ctggtgaacaagctcaagtg-3'	5'-agcaggagaggaagtgttg-3'	53
GAPDH	5'-ggagaaacctgccaagtatg-3'	5'-ctgttctgtagccgtatc-3'	53

• Real-time PCR 결과 및 분석

< 그림 1 > 지방세포에 돼지 정소-추출 스테로이드의 6시간 투여 후 결과

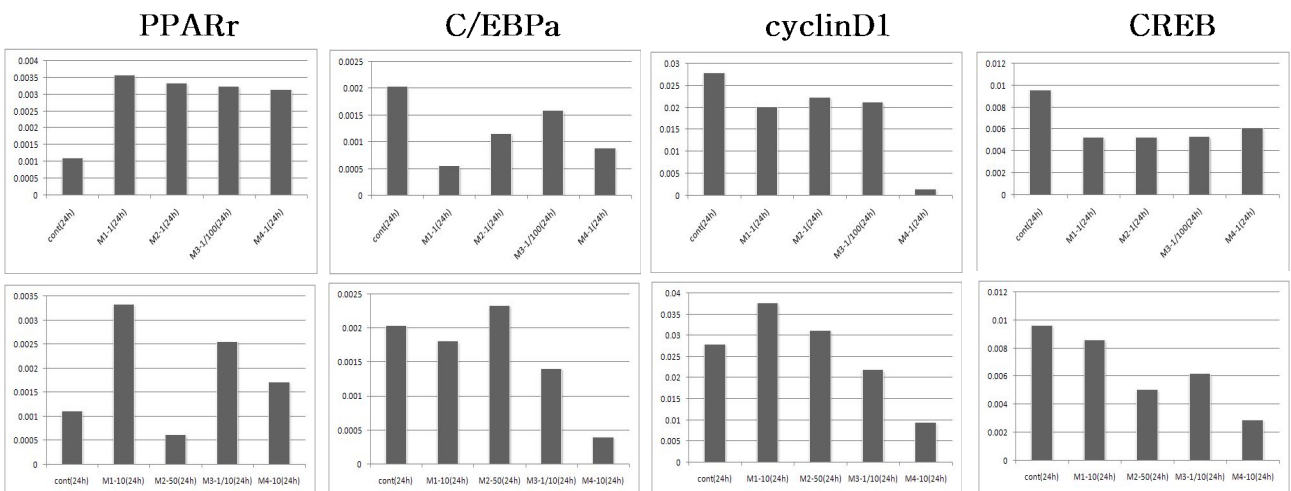


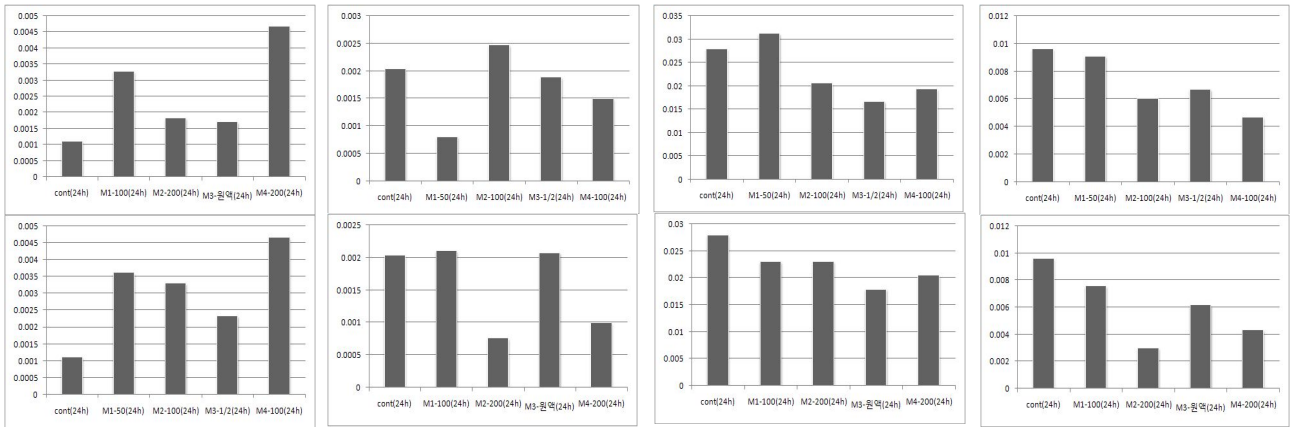


- (가) PPARr 유전자는 M2와 M4 추출 스테로이드를 처리하였을 때 발현이 비교적 증가하였으며, M3 스테로이드는 비교적 PPARr 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 나타남.
- (나) C/EBPa 유전자는 가장 높은 농도에서 스테로이드 처리를 제외하고 비교적 M2에 의해 발현이 증가하였고, M4 스테로이드 혼합물은 PPARr 유전자의 발현과 유사하게 C/EBPa 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 보임.
- (다) cyclinD1 유전자는 M2 스테로이드를 50 ug/ml과 100 ug/ml 처리 시 발현이 가장 많이 증가하였음.
- (라) CREB 유전자는 M1 스테로이드 처리 시 비교적 발현이 증가하였고, M4는 모든 농도에서 CREB 유전자의 발현을 감소시키는 것을 보여주었음.

• 따라서 본 연구는 real-time PCR 결과로부터 돼지 정소-추출 스테로이드를 지방세포에 6 시간 투여 하였을 때 추출 방법과 농도에 따라 지방세포 증식과 분화 관련 유전자의 발현에 차이가 있음이 보여줌.

< 그림 2 > 지방세포에 돼지 정소-추출 스테로이드의 24시간 투여 후 결과



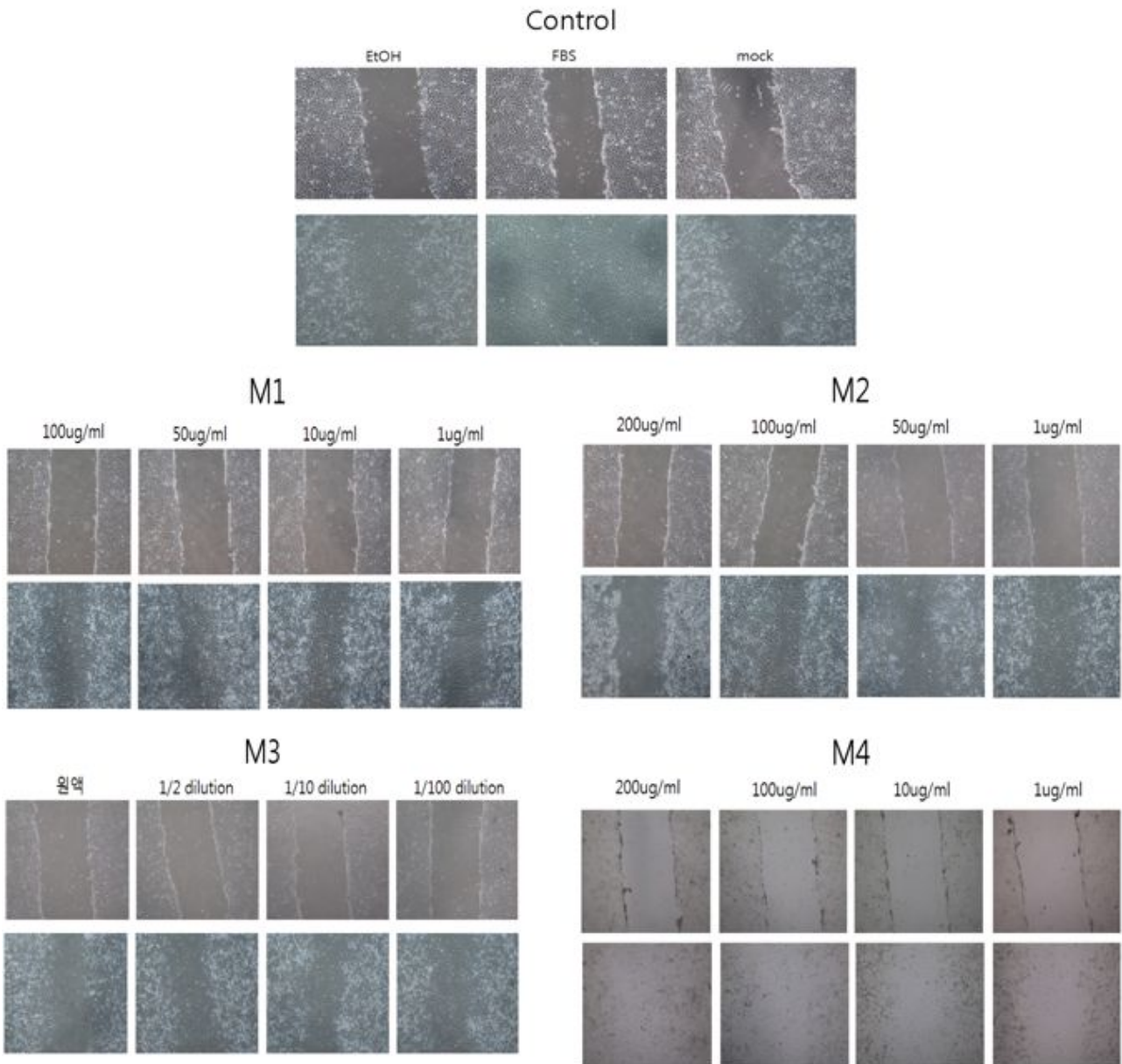


- (가) 낮은 농도로 처리 하였을 때 PPARr 유전자 발현은 모든 정소 추출물 처리에 의해 증가하였으나, 농도를 증가 시켰을 때 비교적 M1과 M4가 PPARr 유전자의 발현을 증가시키는 것을 보여줌.
- (나) C/EBPa 유전자의 발현은 낮은 농도 정소 추출물 처리에서 감소되었으나, 농도에 따라 그 발현 양상이 다르게 나타나며, 전체적으로 M4 추출물로 처리하였을 때 모든 농도에서 C/EBPa 유전자 발현이 감소되는 것을 보여줌.
- (다) cyclinD1 유전자는 M1 추출물을 10 ug/ml과 50 ug/ml 처리 하였을 때를 제외하고 전체적으로 돼지-정소 스테로이드 추출물 처리에 의해 발현이 감소되는 것으로 나타남.
- (라) CREB 유전자의 발현은 모든 돼지 정소-추출물 처리에 의해 감소되며, 특히 M2와 M4 추출물이 처리 농도와 큰 관계없이 전체적으로 CREB 유전자 발현 감소에 큰 영향을 미치는 것으로 보여 짐.

- 돼지 정소-추출 스테로이드를 지방세포에 24시간 처리 하였을 시 지방세포 증식과 분화에 관련된 유전자의 발현은 6시간 처리 한 결과와 다른 점을 보여주었으며, 추출 방법과 투여 농도에 따라 스테로이드가 유전자 발현에 미치는 영향에 차이가 있음을 보여줌.

- Wound healing 기법을 사용한 돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양하고 있는 지방세포를 약물처리하기 하루 전날에 starvation(DMEM with 0.5% FBS, antibiotics, Gibco, Invitrogen)시키고, 약물을 처리하기 전 plate에 스크래치한 후 약물을 처리하고 24시간동안 배양하였음.

< 그림 3 > 돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포 증식에 미치는 영향



- (가) FBS를 첨가한 배양액에서 지방세포의 증식이 에탄올과 FBS가 없는 (mock) 배양액으로 처리하였을 때 보다 빠르게 일어나는 것을 알 수 있음 <그림 3-Control>.
- (나) M1 돼지 정소-추출 스테로이드의 처리는 FBS를 첨가한 배양액의 결과와 비교 하였을 때 농도와 상관없이 지방세포 증식을 비교적 억제하는 것을 보여줌 <그림 3-M1>.
- (다) 돼지 정소-추출 스테로이드의 M2를 처리하였을 때 고농도 (200 ug/ml)에서는 지방세포 증식이 거의 억제되었으며, 모든 농도에서 M1 처리 때 보다 지방세포 증식이 더 억제가 되는 것을 보여줌 <그림 3-M2>.
- (라) 돼지 정소-추출 스테로이드의 M3를 지방세포에 처리하였을 때 농도에 따른 지방세포 증식 억제 효과를 보여 주었음. 특히 원액과 1/2 dilution 농도에서 지방세포 증식 억제 효과가 큰 것으로 판단됨 <그림 3-M3>.

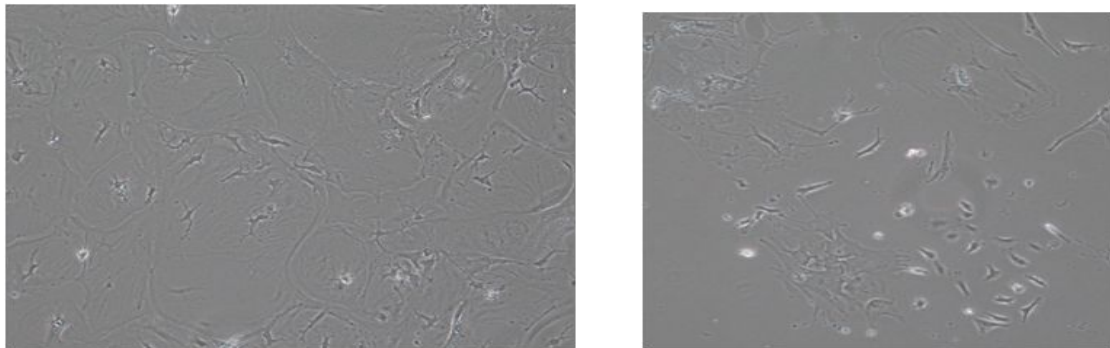
(마) 돼지 정소-추출 스테로이드 M4를 지방세포에 처리하였을 때 비교적 낮은 농도 (1 ug/ml 와 10 ug/ml)에서 지방세포 증식 억제 효과가 고농도 처리 때보다 더 큰 것으로 보임 <그림 3-M4>.

- 따라서 본 연구는 돼지 정소-추출 스테로이드의 추출 방법과 처리 농도 및 처리 기간에 따라 지방세포 증식과 분화에 관련된 유전자의 발현에 차이가 있음을 보여 주었으며, wound healing 연구 방법을 사용하여 모든 돼지 정소-추출 스테로이드 추출물은 지방세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 보여 줌.

2) 돼지 정소-추출 스테로이드가 간질세포 (Leydig cell)의 스테로이드 호르몬 합성 기전에 미치는 영향 연구

숫쥐로부터 정소를 채취한 후 정소를 감싸고 있는 capsule을 제거하고 PBS 용액 내에서 조심스럽게 으깨어서 정소 내 세포들을 채취하였음. 채취된 세포들을 trypsin이 들어있는 PBS 용액으로 옮긴 후 37°C incubator에서 약 20분 동안 흔들여 주었음. incubator에서 빼낸 후에 약 5분간 가만히 놔둔 뒤 상층액만 회수한 후에 DMEM/F-12(with 10% FBS, antibiotics, Gibco, Invitrogen) media를 상층액의 동량을 넣은 뒤 1000rpm에서 5min동안 centrifuge를 한 후에 상층액을 버리고 100mm dish에 transfer한 후 37°C, 5% CO₂에서 12-14시간 동안 incubation 하였음. 세포 배양액은 2-3일에 한번 새로운 DMEM/F-12로 교체하여 주었음.

< 그림4 > 간질세포의 분리 배양



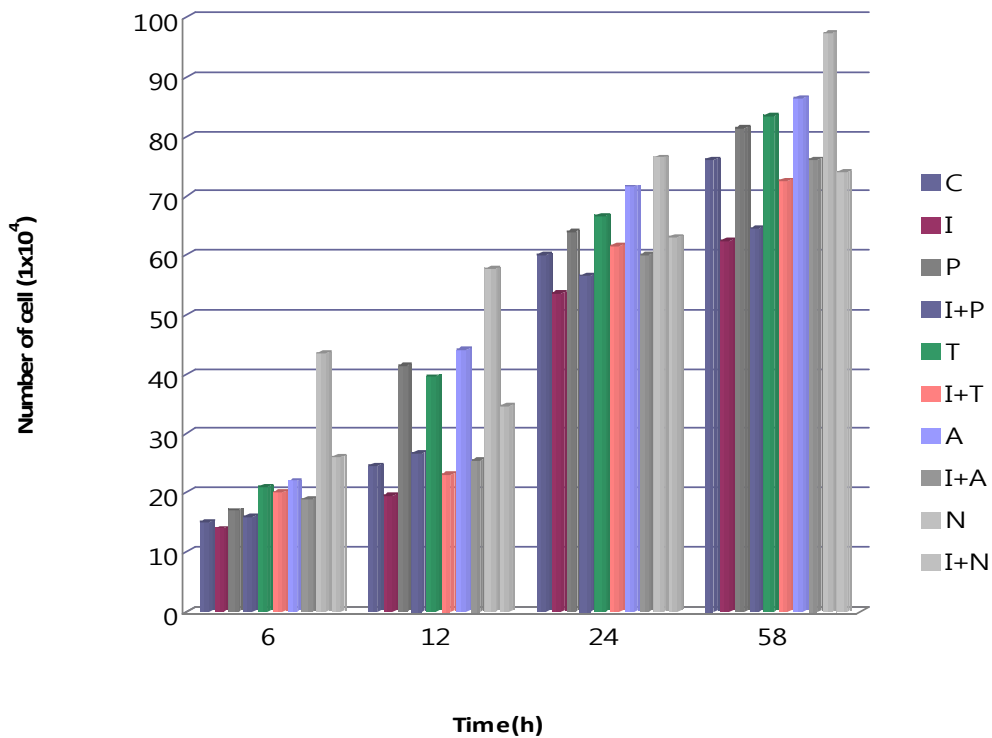
<그림 4> 는 간질세포 추출 후 배양액에서 30일 동안 배양 한 모습. 오른쪽 사진은 세포분열을 통해 기존의 세포로부터 증식을 하고 있는 간질세포의 모습을 보여주고 있음.

숫쥐의 정소로부터 추출한 간질세포를 이용하여 지방세포에서 돼지 정소-추출 스테로이드 투여에 따른 변화를 알아본 것과 유사한 방법으로 스테로이드 추출 방법에 따라 다른 추출물의 투여와 투여 양 그리고 투여 기간에 따른 간질세포에서 스테로이드 합성 관련 유전자의 변화를 real-time PCR 기법을 통해 분석. 본 연구를 수행하기 위해 확인 할 유전자는 Steroidogenic acute regulator (StAR), P450 side chain cleavage(SCC), 17alpha-hydroxylase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase I (3b-HSD1), 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 (17b-HSD3)등으로써 숫쥐의 간질세포에서 스테로이드 합성 관련 주요 유전자임.

< 표 3 > Real-time PCR을 위해 사용된 primer sequence 및 T_m값

gene	sense	anti-sense	T _m (°C)
StAR	5'-CTTGGCTGCTCAGTATTGAC-3'	5'-TGGTGGACAGTCCTTAACAC-3'	52
SCC	5'-CGATACTCTTCTCATGCGAG-3'	5'-CTTTCTTCCAGGCATCTGAAC-3'	55
17alpha-hydroxylase	5'-GATCGGTTTATGCCTGAGCG-3'	5'-TCCGAAGGGCAAATAACTCC-3'	62
3b-HSD1	5'-GGATCATCAAGATGTTGGTGC-3'	5'-TGGTTTCTGGTCGGAATACTT-3'	62
17b-HSD3	5'-ATGGAGTCAAGGAGGAAAGGC-3'	5'-GGCTGTAAAGAGGCCAGGG-3'	62
beta-actin	5'-ACGCCAGGTCATCACTATT-3'	5'-AATGTAGTTTCATGGATGCC-3'	55

본 연구를 수행하기 전에 돼지 정소-추출 스테로이드 내에 다량으로 포함되어 있는 스테로이드 호르몬인 progesterone, testosterone, androstenedione, 그리고 nandrolone을 간질세포에 처리함으로써 간질세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 스테로이드 호르몬을 10nM/ml씩 처리 한 후 6, 12, 24, 그리고 58 시간 뒤에 세포수의 변화를 알아보았음. 추가로 각 호르몬과 함께 P450 aromatase 억제제인 Formestane을 함께 처리함으로써 간질세포의 증식에 미치는 P450 aromatase의 작용을 함께 알아보았음.



< 그림 5 > 숫쥐의 정소로부터 추출한 간질세포 배양에 다양한 스테로이드 호르몬과 P450 aromatase 억제제를, 투여한 후 간질세포 수의 변화.

C: control (ethanol), I: P450aromatase 억제제 (Formestane), P: progesterone, T: testosterone, A:androstenedion, N: nandrolone

각 스테로이드 호르몬을 투여한 후 6시간에서는 nandrolone 투여 군에서 가장 많은 간질세포 증식이 일어남을 볼 수 있었으며, 12시간 투여에 의해 모든 스테로이드 호르몬은 간질세포 증식을 촉진함을 알 수 있었음. 스테로이드 투여 후 24시간과 58시간에서 스테로이드에 의한 간질세포 증식은 12시간보다 미비

하였으나, nandrolone에 의한 간질세포 증식은 모든 투여 시간에서 가장 높게 나타남을 알 수 있었음. 또한 P450 aromatase 억제제인 Formestane을 스테로이드 호르몬과 함께 투여 하였을 때 스테로이드 호르몬에 의한 간질세포 증식 촉진 효과가 억제되는 것을 알 수 있었음

• 따라서, 본 연구는 돼지 정소-추출 스테로이드에 다량으로 함유되어 있는 스테로이드 호르몬에 의한 간질세포의 증식 촉진 효과를 예상 할 수 있으며, 특히 nandrolone이 간질세포의 증식에 크게 영향을 미친다는 사실은 돼지 정소-추출 스테로이드 내 nandrolone 함유량에 따라 간질세포 증식이 조절 될 수 있는 가능성을 보여줌. 본 연구에서 보여준 결과는 nandrolone이 정소 내 간질세포 증식을 증가시킬 수 있다는 최초의 연구 결과임.

2. 숫쥐의 번식력, 정소와 부정소, 전립선 등 생식기관에 미치는 영향 연구

1) 돼지 정소-추출 스테로이드가 정소 내 정자 생성에 미치는 영향 연구

주관 연구 책임자에 의해 추출된 돼지 정소 스테로이드 추출물 중 Nandrolone과 Testosterone 함량이 가장 낮은 추출물 (M1)과 가장 높은 추출물 (M4)을 선택하여 각 추출물을 100% 에탄올을 사용하여 1%와 0.1% 추출물로 희석한 후 성숙한 쥐 (2달령)에 2주 동안 이틀에 한 번씩 매회 0.1 ml를 피하 투여하였음.

본 연구는 돼지 정소 스테로이드 추출물 중 Nandrolone의 효과를 비교 분석하기 위하여 대조군 (100% 에탄올), 1% M1 처리군 (M1 high), 0.1% M1 처리군 (M1 low), 1% M4 처리군 (M4 high) 그리고 0.1% M4 처리군 (M4 low)등 5개 실험군 외에 추가로 32 ng Nandrolone 처리군 (ND high)와 3.2 ng Nandrolone 처리군 (ND low)을 포함한 총 7개 실험군 으로 구성되었음.

본 연구를 위해 사용한 돼지 정소 추출물 내 함유된 주요 스테로이드 성분 및 함량은 아래 <표 1>에 기술되어 있음.

< 표 1 > M1, M4의 스테로이드 호르몬 조성

	M1	M4
Nandrolone	2.604($\mu\text{g/g}$)	3224.01 (ng/ml)
Testosterone	10.416($\mu\text{g/g}$)	1527.76 (ng/ml)
Androstenedione	325.08(ng/g)	68.69 (ng/ml)
Estradiol	547.18(ng/g)	276.52 (ng/ml)
Estrone	320.38(ng/g)	207.19 (ng/ml)

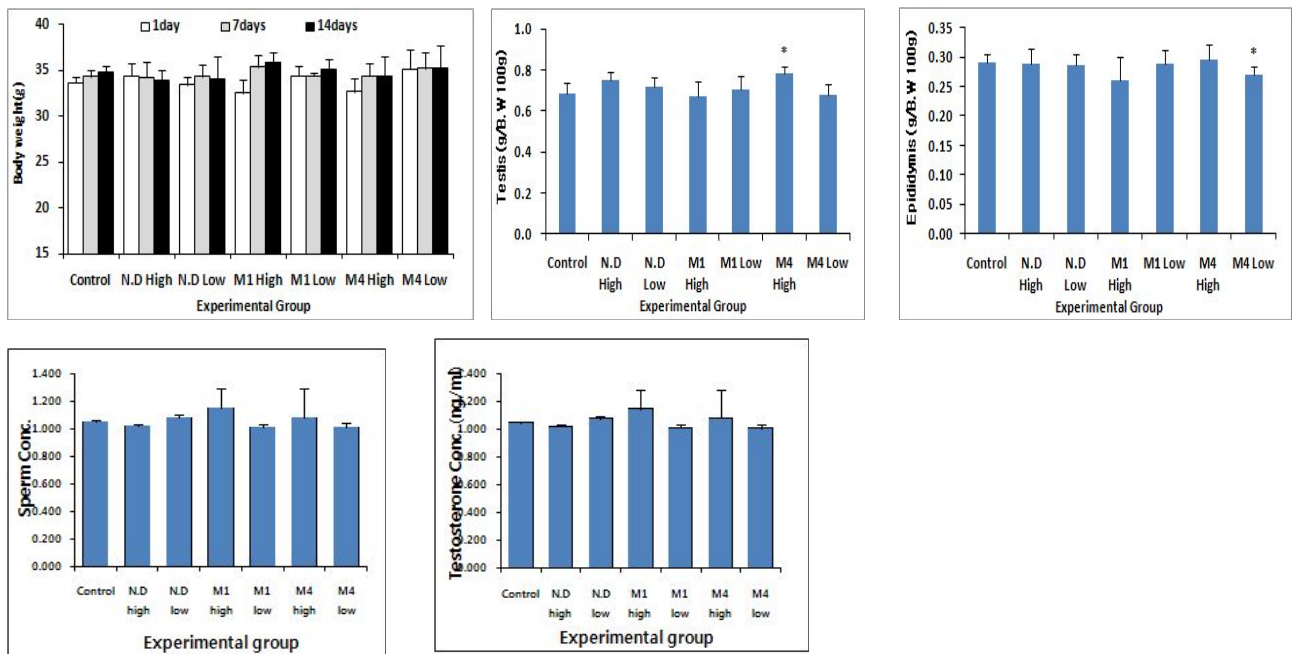
M1과 M4는 각각 주관 연구 책임자에 의해 돼지 정소로부터 스테로이드 혼합물을 추출한 방법 1과 4를 의미함.

돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone을 2주간 투여하는 동안 체중의 변화를 알아보기 위해 투여 전, 투여 후 1주일, 투여 후 2주일에 실험동물의 체중을 측정하여 기록하였으며, 약물 투여 후 약물이 남성 생식기관에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물로부터 정소와 부정소를 채취하여 각 기관의 무게를 측정하였음.

또한, 정소 스테로이드 추출물의 투여가 정소에서 테스토스테론 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈액 내 테스토스테론 양을 Testosterone ELISA kit (DRG. EIA-1559)을 사용하여 측정하였음. 각 well에 control, 샘플, standard 50 ul를 분주하고, Enzyme conjugate 100 ul 씩 첨가한 후 1시간 동안 실온에서 방치한 후 분석플레이트는 washing buffer로 3번 세척 후 Substrate solution 150 ul 첨가하여 30분 동안 방치하였고 30분 후 stop solution 100 ul를 첨가, 450 nm로 측정하였음.

정소 내 정자의 수는 절제된 고환조직을 직경 30 mm 배양 접시에 담긴 PBS에 넣고 해부현미경하에서 정소 캡슐을 제거한 후 정세관을 멸균된 25gauge 주사침이 부착된 1 ml 주사기를 이용하여 짜내고 잘게 절단하였음. 절단된 조직은 피펫으로 흡입간 배출을 반복하여 정자 배출을 유도하였고 추출된 정자 부유액은 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 2번 세척하였음. 상층액을 제거하고 정자괴를 1 ml PBS로 희석하였으며 정자농도는 Markler counting chamber를 이용하여 현미경으로 관찰 후 계산하였음.

< 그림 1 > 돼지 정소 스테로이드 추출물 투여 후 몸무게, 정소와 부정소 무게, 정자수 그리고 혈중 테스토스테론 농도 변화.



(가) 돼지 정소 스테로이드 추출물 M1과 M4 그리고 Nandrolone을 2주 동안 피하 투여하였을 시 대조군과 비교하여 체중의 변화는 없었음.

(나) Nandrolone과 M1 추출물을 투여한 쥐의 정소 무게는 대조군과 차이가 없음을 알 수 있었으나, M4

(high)군에서 정소의 무게가 대조군보다 증가하는 것을 알 수 있었음.

- (다) 부정소의 무게는 모든 실험군에서 대조군과 차이가 없었으나, M4 (low)군에서 대조군에 비교하여 줄어드는 것을 알 수 있었음.
- (라) 정소 내 정자의 수와 혈중 테스토스테론 농도는 모든 실험군에서 크게 변화하지 않음을 알 수 있었음.

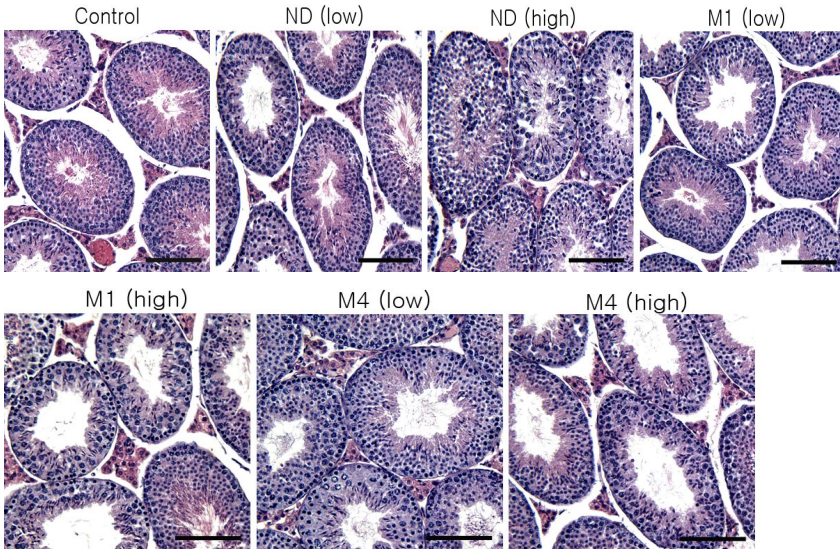
2) 돼지 정소-추출 스테로이드가 정소, 부정소 그리고 전립선에 미치는 영향 연구 (형태학적 변화)

돼지 정소 스테로이드 추출물이 남성 생식 기관인 정소, 부정소 그리고 전립선의 형태학적 변화를 야기하는지 알아보기 100% 에탄올 (대조군), 1% M1 처리군 (M1 high), 0.1% M1 처리군 (M1 low), 1% M4 처리군 (M4 high) 그리고 0.1% M4 처리군 (M4 low)등 5개 실험군 외에 추가로 32 ng Nandrolone 처리군 (ND high)와 3.2 ng Nandrolone 처리군 (ND low)을 포함한 총 7개 실험군의 숫 생쥐로부터 남성 생식 기관을 채취한 후 Bouin's solution에 12-14시간동안 고정시킨 후 여러 농도의 에탄올에서 탈수 과정, xylene에서 clearing 과정, 그리고 paraffin에서 infiltration 과정을 통한 후 조직별로 paraffin block을 준비하였음.

paraffin block에 있는 조직은 5 μ m 두께로 절편 하여 슬라이드에 붙인 후 에탄올에서 rehydration 과정을 통하고 Hemotoxylene으로 염색을 시행하였음. 과다한 hemotoxylene 염색은 흐르는 물에서 제거하고 eosin으로 counter-staining을 한 후 다시 에탄올에서 탈수 과정을 통한 후 xylene에서 clearing 과정을 수행한 후 cover glass로 조직을 덮은 후 광학 현미경을 통해 남성 생식 기관별로 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 생쥐의 조직에서 형태학적 변화를 관찰하고 digital camera로 사진을 찍은 후 분석하였음.

본 연구에서 분석한 조직은 정소, efferent ductules, initial segment, caput epididymis, corpus epididymis, caudal epididymis 그리고 전립선 이었음.

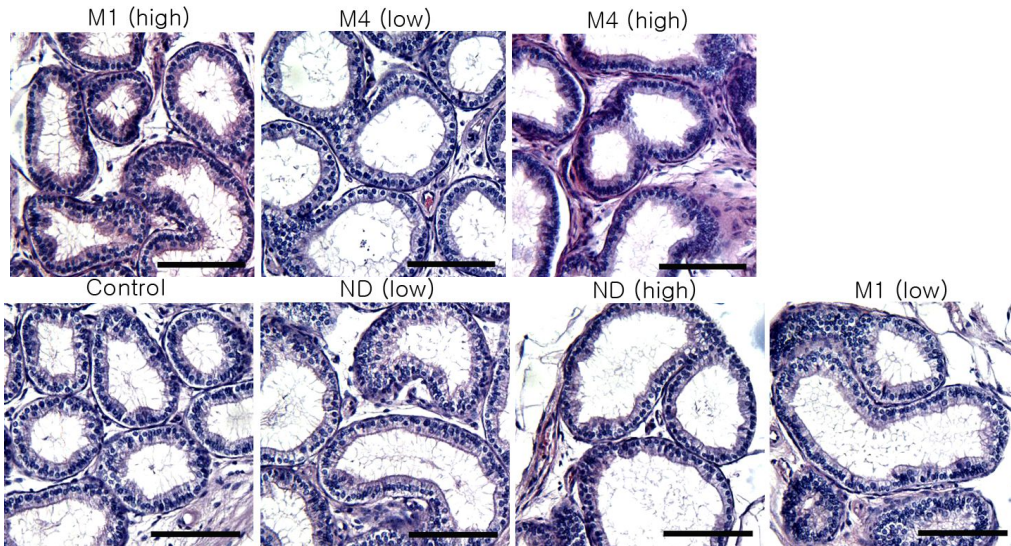
< 그림 2 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 정소에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군에서 형태학적 변화가 보여 지지 않았으나, ND (high)군에서는 일부 seminiferous tubules내에서 germ cell sloughing (germ cell이 Sertoli cell로부터 떨어져 나가는 현상)이 보여 졌음.

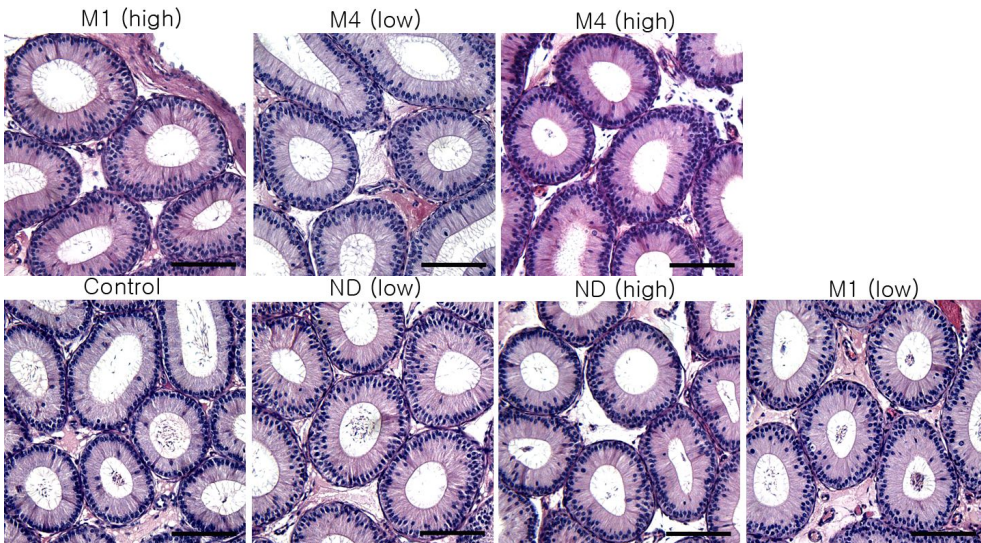
< 그림 3 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 Efferent ductules에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군에서 어떠한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

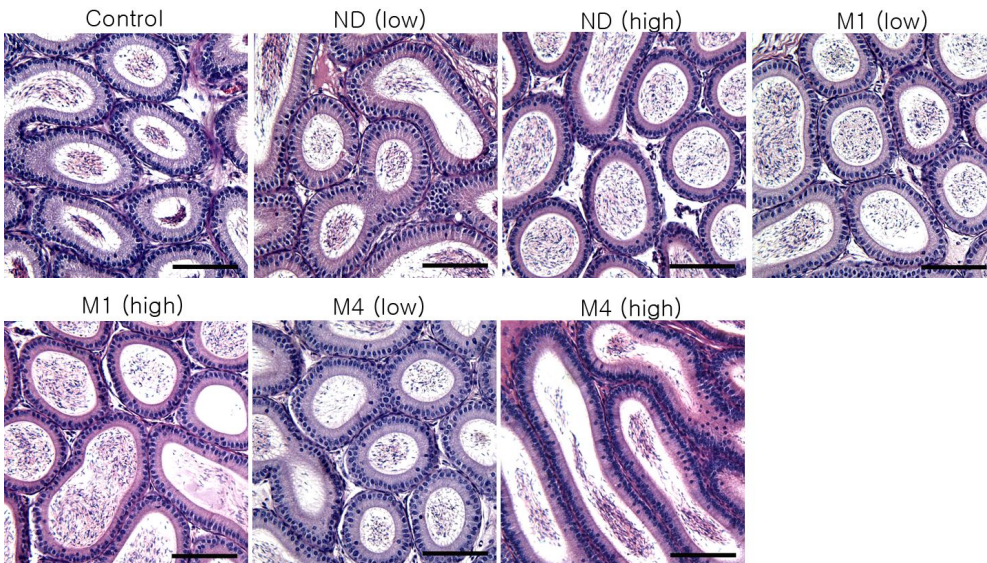
< 그림 4 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 Initial segment에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군에서 Initial segment에서 어떠한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

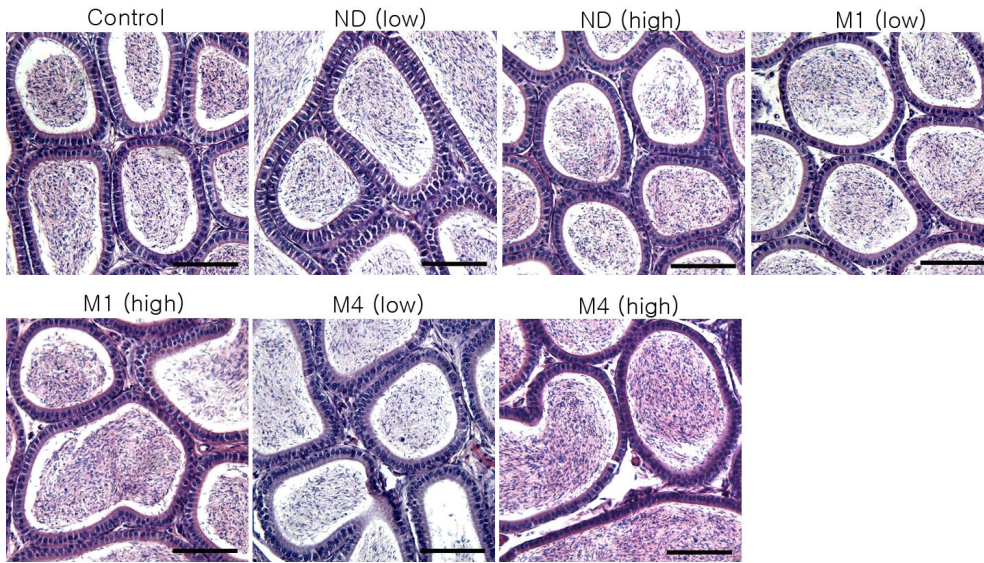
< 그림 5 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 Caput epididymis에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군의 Caput epididymis에서 어떠한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

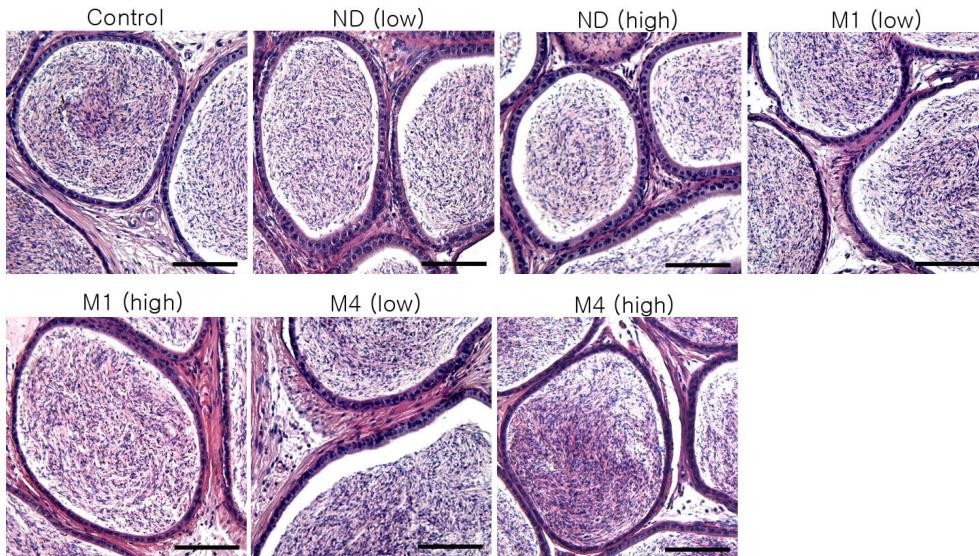
< 그림 6 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 Corpus epididymis에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군의 Corpus epididymis에서 어떠한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

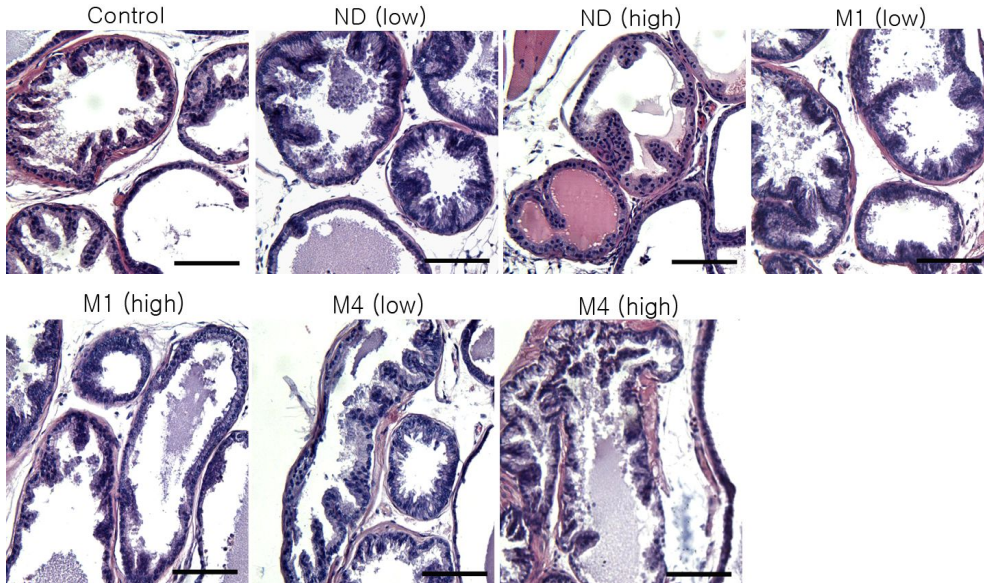
< 그림 7 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 Caudal epididymis에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군의 Caudal epididymis에서 어떠한 특이한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

< 그림 8 > 돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone 투여 후 수 생쥐의 전립선에서 형태학적 변화



Control : 100% 에탄올, ND (low) : 3.2 ng Nandrolone, ND (high) : 32 ng Nandrolone, M1 (low) : 0.1% M1, M1 (high) : 1% M1, M4 (low) : 0.1% M4, M4 (high) : 1% M4

대조군과 비교하여 ND (low), ND (high) M1 (low), M1 (high), M4 (low) 그리고 M4 (high)군의 전립선에서 어떠한 특이한 형태학적 변화 및 이상이 발견되지 않았음.

3) 돼지 정소-추출 스테로이드가 정소 내 스테로이드 호르몬 합성 유전자와 스테로이드 호르몬 수용체의 발현에 미치는 영향 연구

돼지 정소 스테로이드 추출물 M1과 M4가 정소 내 스테로이드 호르몬 합성 유전자와 스테로이드 호르몬 수용체의 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 추출물과 Nandrolone을 2주 동안 피하 투여한 수 생쥐로부터 정소를 채취한 후 Total RNA isolation solution을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, UV spectrophotometer를 사용하여 추출된 total RNA의 농도를 측정하였고 agarose gel에서 RNA의 상태를 확인하였음.

각 실험군에서 추출된 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후 real-time PCR 기법을 사용하여 스테로이드 합성 관련 유전자 5개 (P450 side chain cleavage, Steroidogenic acute transmembrane regulator, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450 aromatase)와 스테로이드 호르몬 수용체 2개 (androgen receptor, estrogen receptor alpha)의 발현 양상을 비교, 분석하였음. Real-time PCR에서 internal control로써 cyclophilin A를 사용하였고, 또한 대조군 (ethanol 처리군)에서 각 유전자의 발현을 실험군과 비교함으로써 돼지 정소-추출 스테로이드의 투여에 따른 유전자 발현 변화를 알아보았음.

Real-time PCR에 의해 유전자 발현을 알아보기 위한 primer sequence와 PCR condition에 대한 정보는

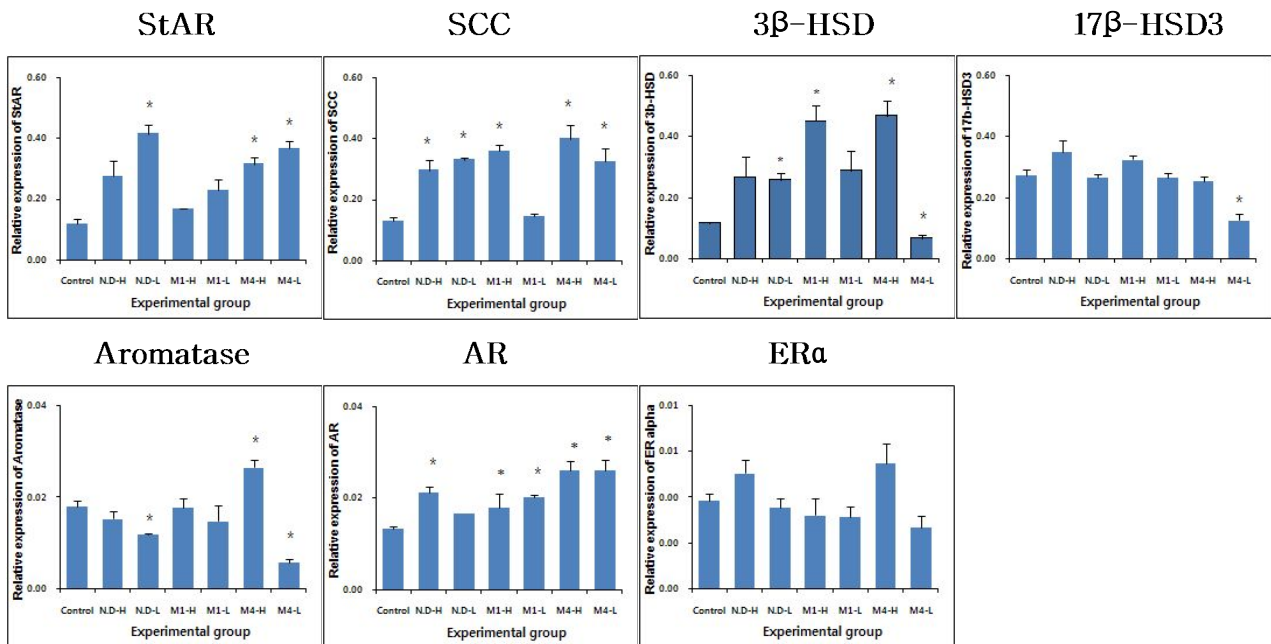
아래 <표 2>에 정리되어 있음.

< 표 2 > Real-time PCR을 위해 사용된 primer sequence 및 T_m값

gene	sense	anti-sense	T _m (°C)
SCC	GTTGGCTGCTCAGTATTGAC	TGGTGGACAGTCCTTAACAC	54
StAR	CGATACTCTTCTCATGCGAG	CTTTCTTCCAGGCATCTGAAC	54
17β-HSD3	ATGGAGTCAAGGAGGAAAGGC	GGCTGTAAAGAGGCCAGGG	55
3β-HSD	GGATCATCAAGATGTTGGTGC	TGGTTTCTGGTCGGAATACTT	62
Aromatase	TGTGTTGACCCTCATGAGACA	CTTGACGGATCGTTCATACTTTC	60
AR	TGTCAAAGTGAAATGGGACC	TGGTACTGTCCAAACGCATGT	56
ER α	GCCTCTGGCTACCATTATGG	CATCTCTCTGACGCTTGTGC	60
Cyclophilin A	GGTCCATCTACGGAGAGAAA	GGTGATCTTCTTGCTGGTCT	59

SCC : cytochrome P450 side chain cleavage, StAR : steroidogenic acute transmembrane regulator, 17β-HSD3 : 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 3, 3β-HSD : 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, Aromatase : cytochrome P450 aromatase, AR : androgen receptor, ERα : estrogen receptor α

• Real-time PCR 결과 및 분석



(가) StAR 유전자는 ND (low), M4 (low), M4 (high)군에서 대조군과 비교하였을 때 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하는 것이 보여 졌음.

(나) SCC 유전자는 M1 (low)군을 제외하고 대조군과 비교하였을 때 ND (high), ND (low), M1 (high),

M4 (low) 그리고 M4 (high)군에서 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하는 것을 보여주었음

- (다) 3 β -HSD 유전자는 ND (low), M1 (high), M4 (high)군에서 대조군보다 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하는 것을 보여 주었으며, M4 (low)군에서는 대조군보다 발현이 감소하는 것으로 나타남.
- (라) 17 β -HSD3 유전자는 M4 (low)군에서 대조군보다 통계학적으로 유의하게 발현이 감소하였으나 나머지 실험군은 대조군과 발현양의 변화가 없었음.
- (마) Aromatase 유전자는 대조군과 비교하였을 때 ND (low)와 M4 (low)군에서 유의하게 발현이 감소하였으며 M4 (high)군에서 유의하게 발현이 증가하는 것을 보여주었음.
- (바) Androgen receptor는 ND (low)군을 제외하고 나머지 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하였으나, estrogen receptor alpha는 발현에 변화가 없었음.

4) 돼지 정소-추출 스테로이드가 전립선에 존재하는 주요 유전자의 발현에 미치는 영향 연구

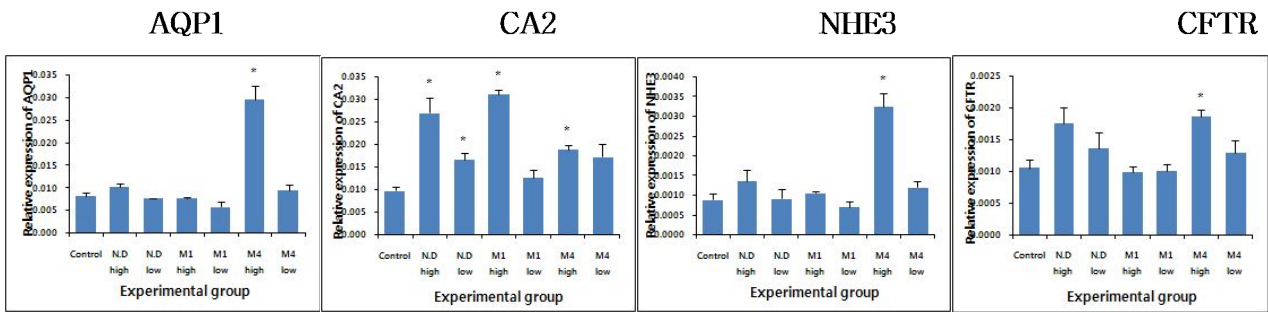
정소에서 발현하는 스테로이드 합성 유전자와 스테로이드 수용체 발현 연구에서와 동일한 실험 방법과 기법을 사용하여 전립선에서 발현하는 4개 (aquaporin 1, Na⁺/H⁺ exchanger 3, carbonyl reductase 2, cystic fibrosis transmembrane regulator)의 발현 변화를 알아보았으며 real-time PCR을 위해 사용한 primer에 대한 정보는 아래 <표 3>에 정리되어 있음.

< 표 3 > Real-time PCR을 위해 사용된 primer sequence 및 T_m값

gene	sense	anti-sense	T _m (°C)
AQP1	TAAAGTGGCAAGGAAGGGACAG	CTGGAGGACCGAAATAAACATC	59
NHE3	CCACACACTGCAACAGTACC	ATAGGCAGTTTCCCATTAGG	56
CA2	AGAACTGGCACAAGGACTTC	CTGCATTGTCCTGAGAGTCA	53
CFTR	CCGATCAGTTCTCAGTAAGG	GAGTCGTA CTGCCAGACATT	52
Cyclophilin A	GGTCCATCTACGGAGAGAAA	GGTGATCTTCTTGCTGGTCT	59

AQP1 : aquaporin 1, NHE3 : Na⁺/H⁺ exchanger 3, CA2 : carbonyl reductase 2, CFTR : cystic fibrosis transmembrane regulator

• Real-time PCR 결과 및 분석



- (가) 전립선에서 AQP1의 발현은 대조군과 비교하여 M4 (high)군에서만 통계학적으로 유의하게 발현이 증가하였으며, 나머지 실험군에서는 발현의 변화가 없었음.
- (나) CA2의 발현은 ND (high), ND (low), M1 (high), M4 (high)에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가함을 보여주었음.
- (다) NHE3는 AQP1 발현 양상과 동일하게 M4 (high)군에서만 대조군에 비하여 유의하게 발현이 증가하였으며, 나머지 실험군에서는 발현의 변화가 없었음을 보여줌.
- (라) CFTR의 발현 양상 변화는 NHE3와 AQP1의 발현 양상과 동일하게 M4 (high)군에서만 대조군에 비교하여 통계적으로 유의하게 발현이 증가함을 보여주었음.

• 따라서 본 연구는 돼지 정소 스테로이드 추출물 (M1과 M4)을 숫 생쥐에 2주 동안 피하 투여하였을 때 정소를 포함한 남성 생식 기관 전반에 형태학적 변화를 야기하지 않았으며, 1% M4 추출물의 투여가 정소 내 스테로이드 합성 관련 유전자의 발현을 증가시켰고 전립선에서 주요 유전자의 발현을 증가시킬 수 있었음. 결국, 본 연구에서 사용된 돼지 정소 스테로이드 추출물의 사용은 남성 생식 기관에 비교적 긍정적인 결과를 야기하는 것으로 판단되며 짧은 기간 동안의 투여는 in vivo 상황에서 남성 생식 기관에 커다란 나쁜 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.

3. 비만 억제 효과, 지방 분화와 증식에 미치는 영향 연구

1) 돼지 정소-추출 스테로이드가 체중과 부위별 지방의 무게 그리고 정소와 부정소의 무게에 미치는 영향

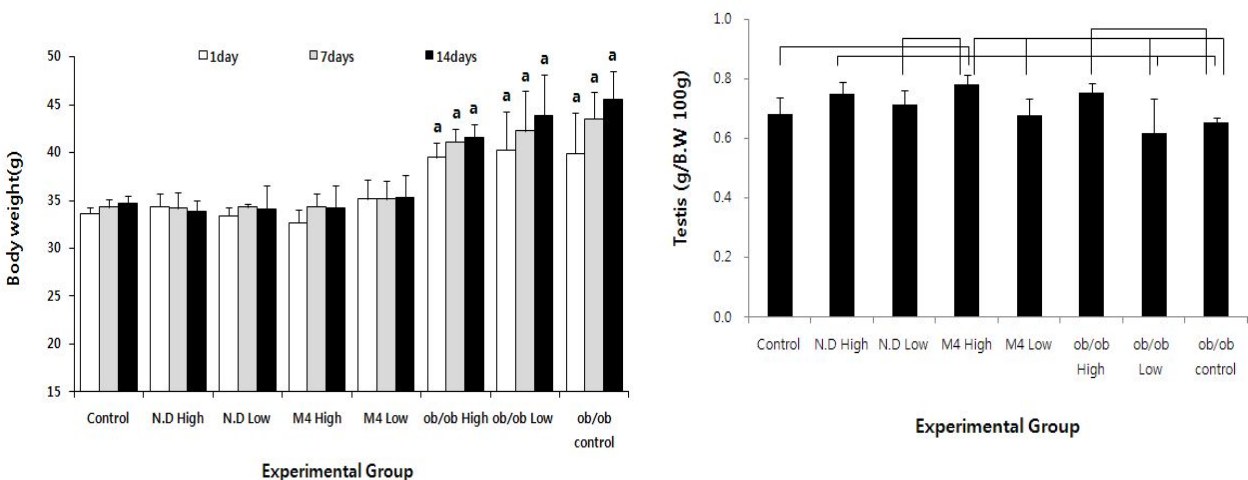
주관 연구 책임자에 의해 추출된 돼지 정소 스테로이드 추출물 중 Nandrolone과 Testosterone 함량이 가장 높은 추출물 (M4)을 선택하여 각 추출물을 100% 에탄올을 사용하여 1%와 0.1% 추출물로 희석한 후 성숙한 쥐 (2개 월령)에 2주 동안 이들에 한 번씩 매회 0.1 ml를 피하 투여하였음.

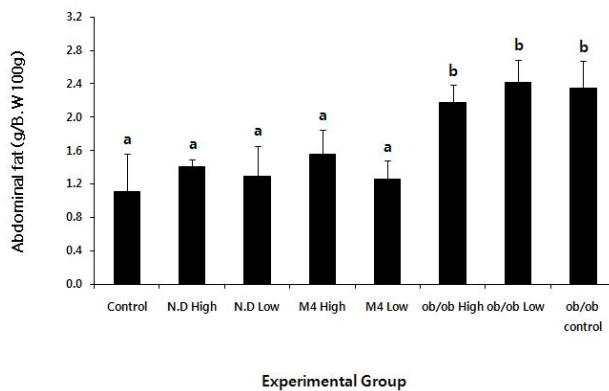
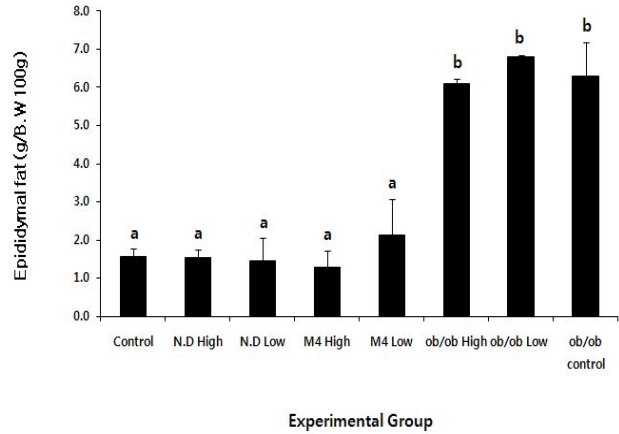
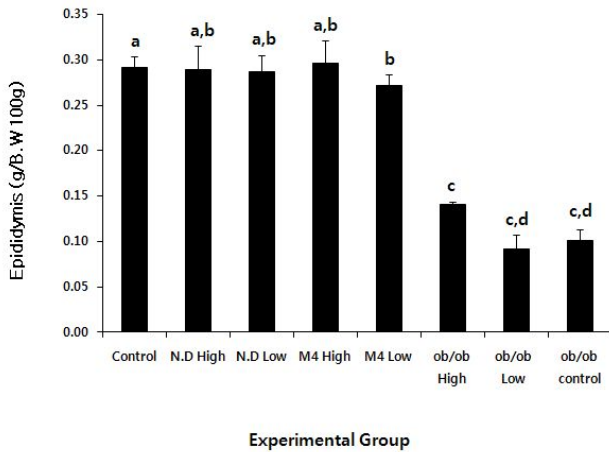
본 연구는 돼지 정소 스테로이드 추출물 중 Nandrolone의 효과를 비교 분석하기 위하여 대조군 (100% 에탄올), 1% M4 처리군 (M4 high) 그리고 0.1% M4 처리군 (M4 low)등 3개 실험군 외에 추가로 32 ng Nandrolone 처리군 (ND high)와 3.2 ng Nandrolone 처리군 (ND low)을 포함한 총 5개 실험군으로 구성 되었음.

추가로 돼지 정소 스테로이드 추출물이 비만 유도 transgenic mouse (Ob/Ob knockout mouse)에 투여하였을 때 지방 세포의 증식과 분화를 억제함으로써 비만 정도를 약화시킬 수 있는지를 알아보기 위해 Ob/Ob knockout mouse를 control(100% 에탄올), 1% M4 처리군 (M4 high) 그리고 0.1% M4 처리군 (M4 low)등 총 3개 실험군을 추가하였음; 결국 본 연구는 총 8개의 실험군으로 구성되었음.

돼지 정소 스테로이드 추출물과 Nandrolone을 2주간 투여하는 동안 체중의 변화를 알아보기 위해 투여 전, 투여 후 1주일, 투여 후 2주일에 실험동물의 체중을 측정하여 기록하였으며, 약물 투여 후 약물이 지방 조직에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물로부터 abdominal fat과 epididymal fat을 채취하여 각 기관의 무게를 측정하였음.

< 그림 1 > 돼지 정소 스테로이드 추출물 투여 후 몸무게, 정소와 부정소 무게 그리고 내장 지방과 부정소 지방의 무게 변화





- (가) 돼지 정소-추출 스테로이드를 정상 male mouse에 2주 동안 투여하였을 때 각 주별 체중에는 변화가 없었으며, Ob/Ob knockout mouse에서도 정상 mouse에서 일어난 것과 같이 체중 변화가 나타나지 않았음. 또한 Nandrolone을 투여한 실험군에서도 체중 변화가 일어나지 않았음.
- (나) 돼지 정소-추출 스테로이드를 투여하였을 때 정소 무게의 변화는 매우 복잡한 양상을 나타냈음. 정상 쥐의 control군과 비교하였을 때 M4 high 실험군에서 정소 무게가 통계학적으로 유의하게 증가함을 보여주었음. ND high 실험군의 정소 무게는 low M4를 처리하거나 control Ob/Ob knockout mouse 보다 유의하게 증가하였음. M4 high 실험군의 정소 무게는 ND low, M4 low, low Ob/Ob knockout mouse와 control Ob/Ob knockout mouse 실험군보다 유의하게 증가하였음. 또한 high Ob/Ob knockout mouse의 정소 무게는 low Ob/Ob knockout mouse와 control Ob/Ob knockout mouse보다 더 무거운 것으로 나타남.
- (다) 부정소의 무게는 정상 male mouse에서 돼지 정소-추출 스테로이드 또는 Nandrolone 투여와 상관없이 크게 변화하지 않는 것을 보여주었으며, 유사한 현상은 Ob/Ob knockout mouse에 돼지 정소-추출 스테로이드를 추출하였을 때도 나타났음. 그러나 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 무게는 정상 mouse보다 유의하게 가벼운 것으로 나타남.
- (라) 부정소의 무게와 반대로 부정소 지방과 내장 지방의 무게는 Ob/Ob knockout mouse가 정상 male mouse보다 통계학적으로 유의하게 높은 것을 알 수 있었음. 그러나 정소-추출 스테로이드 또는 Nandrolone의 투여는 지방 무게에 변화를 일으키지 않음을 알 수 있었음.

본 연구결과는 돼지 정소-추출 스테로이드를 2주 동안 피하 투여하는 것은 부정소 지방과 내장 지방의 무게에는 큰 영향을 미치지 않음을 보여주었음.

2) 돼지 정소-추출 스테로이드가 내장 지방에서 지방 증식과 분화에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향

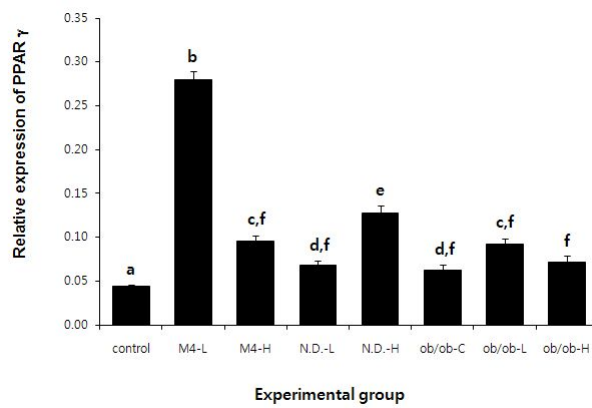
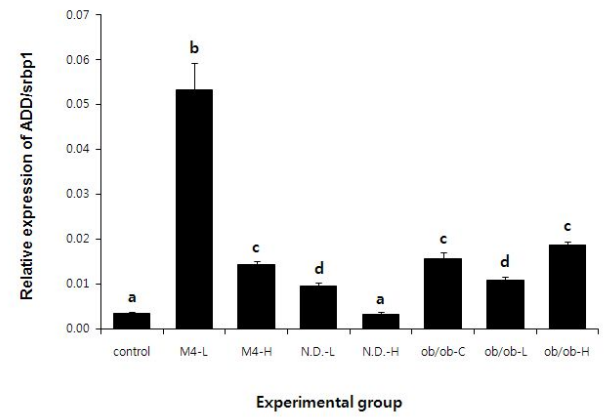
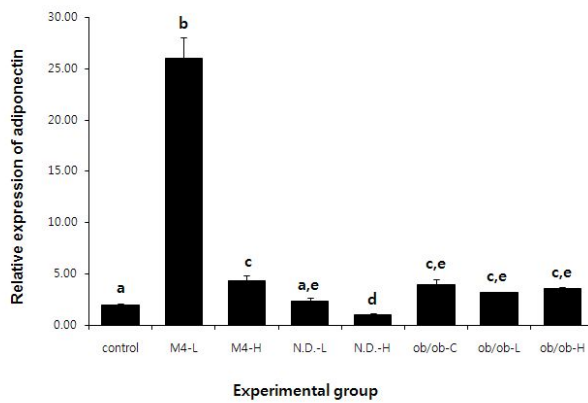
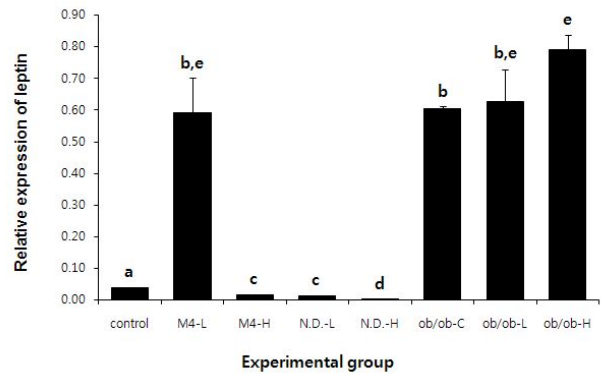
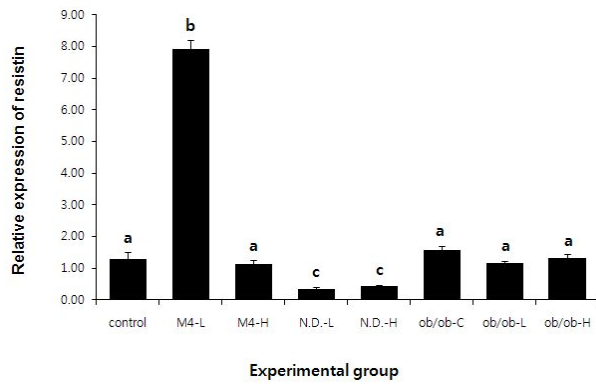
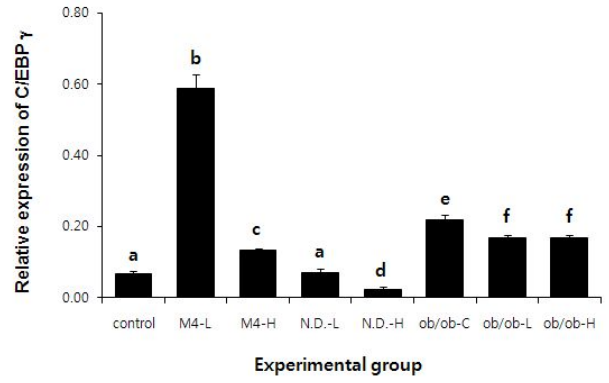
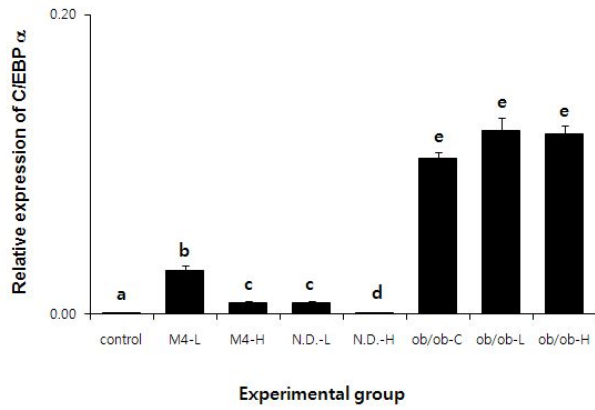
돼지 정소 스테로이드 추출물 M4가 내장 지방의 증식과 분화에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 추출물과 Nandrolone을 정상 쥐와 Ob/Ob knockout 쥐에 2주 동안 피하 투여한 내장 지방을 채취한 후 Total RNA isolation solution을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, UV spectrophotometer를 사용하여 추출된 total RNA의 농도를 측정하였고 agarose gel에서 RNA의 상태를 확인하였음.

각 실험군에서 추출된 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후 real-time PCR 기법을 사용하여 지방 증식과 분화에 관여하는 것으로 알려진 유전자(총 7종류, leptin, adiponectin, resistin, ADD/srebp1, C/EBP alpha, C/EBP gamma, PPAR gamma)의 발현 양상을 비교, 분석하였음. Real-time PCR에서 internal control로써 GAPDH를 사용하였고, 또한 대조군 (ethanol 처리군)에서 각 유전자의 발현을 실험군과 비교함으로써 돼지 정소-추출 스테로이드의 투여에 따른 유전자 발현 변화를 알아보았음.

Real-time PCR에 의해 유전자 발현을 알아보기 위한 primer sequence와 PCR condition에 대한 정보는 아래 <표 2>에 정리되어 있음

< 표 2 > Real-time PCR을 위해 사용된 primer sequence 및 T_m값

gene	sense	anti-sense	T _m (°C)
leptin	ttcacacacgcagtcggtat	tcattggctatctgcagcac	59
adiponectin	ccgcttatgtgtatcgctca	tgaagaggctcacctcaca	61
resistin	ttccttgccctgaactgct	tcaagactgctgtgcttet	59
ADD/srebp1	aggtcaccgtttctttgtgg	tccaagggcatctgagaact	61
C/EBP alpha	aaagccaagtcggtgga	cggtcattgtcactgggtcaa	58
C/EBP gamma	accatggatcggaatagtg	gettccaaccgttcattctc	61
PPARgamma	aagagctgaccaatggttg	acccttgcaccttcacaag	64
GAPDH	actccactcacggcaaatc	ttccatggtggtgaagaca	59



- (가) C/EBP alpha 유전자의 발현은 정상 생쥐에 low M4를 처리하였을 때 control과 비교하여 매우 증가하며 M4 high와 ND low에서도 통계학적으로 유의성이 있게 증가하는 것을 보여 주었음. 그러나 ND high 처리군에서 C/EBP alpha 유전자의 발현은 급격히 감소하는 것을 알 수 있었음. Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 C/EBP alpha 유전자 발현은 정상 쥐에서 보다 매우 높게 발현되는 것을 알 수 있었으나 폐지 정소-추출 스테로이드의 투여는 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 C/EBP alpha 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었음.
- (나) C/EBP gamma 유전자의 발현은 C/EBP alpha 유전자의 발현과 매우 유사한 경향을 나타냈음. M4 low와 high 실험군에서 C/EBP gamma 유전자의 발현이 매우 높게 증가하였으며 ND high 실험군에서 C/EBP gamma 유전자의 발현이 감소하였음. C/EBP alpha 유전자와 같이 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 C/EBP gamma 유전자 발현이 증가하였으며 Ob/Ob knockout mouse에 M4를 처리하였을 때 통계학적으로 유의성 있게 감소하는 것을 보여주었음.
- (다) Resistin의 유전자 발현은 low M4를 처리하였을 때 높게 증가하였으며, ND로 처리하였을 때 control군과 비교하여 유전자 발현이 매우 감소하는 것을 알 수 있었음. C/EBP alpha와 gamma 유전자의 발현과 달리 resistin 유전자의 발현은 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서는 control군과 비교하였을 때 변화가 없음을 알 수 있었음.
- (라) leptin의 유전자 발현은 resistin의 유전자 발현과 유사하게 low M4로 처리한 실험군에서 매우 높게 증가하였으며 high M4와 ND를 처리한 실험군에서 유전자 발현이 감소한 것을 알 수 있었음. 그러나 resistin과는 달리 leptin의 유전자 발현은 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 매우 높게 증가하였으며 특히 high M4를 처리한 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 control Ob/Ob knockout mouse보다 발현이 더 증가하는 것을 알 수 있었음.
- (마) adiponectin의 유전자 발현은 M4를 처리한 실험군에서 증가하였으며, high ND를 처리한 실험군에서 감소하는 것을 보여주었음. 정상 mouse와 비교하여 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 adiponectin의 발현은 증가하였으나 M4의 처리는 adiponectin 발현에 영향을 주지 않았음.
- (바) ADD/srbp1의 유전자 발현은 2개의 M4 처리군과 low ND 처리군에서 정상군에 비교하여 증가하는 것을 알 수 있었으며 high ND 처리군에서는 발현 양에 변화가 없음을 알 수 있었음. Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서 ADD/srbp1의 유전자 발현은 정상 mouse에서보다 매우 증가하였으나 low M4를 처리하였을 때 유전자 발현양이 control Ob/Ob knockout mouse보다 감소하는 것을 알 수 있었음.
- (사) PPAR gamma 유전자의 발현은 다른 유전자의 발현과 마찬가지로 low M4 처리군에서 가장 많이 증가하는 것을 보여주었으며, 나머지 실험군에서 PPAR gamma 발현양이 대조군과 비교하여 증가하는 것을 알 수 있었음. 그러나 Ob/Ob knockout mouse에서 M4의 처리는 PPAR gamma 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 것을 보여주었음.

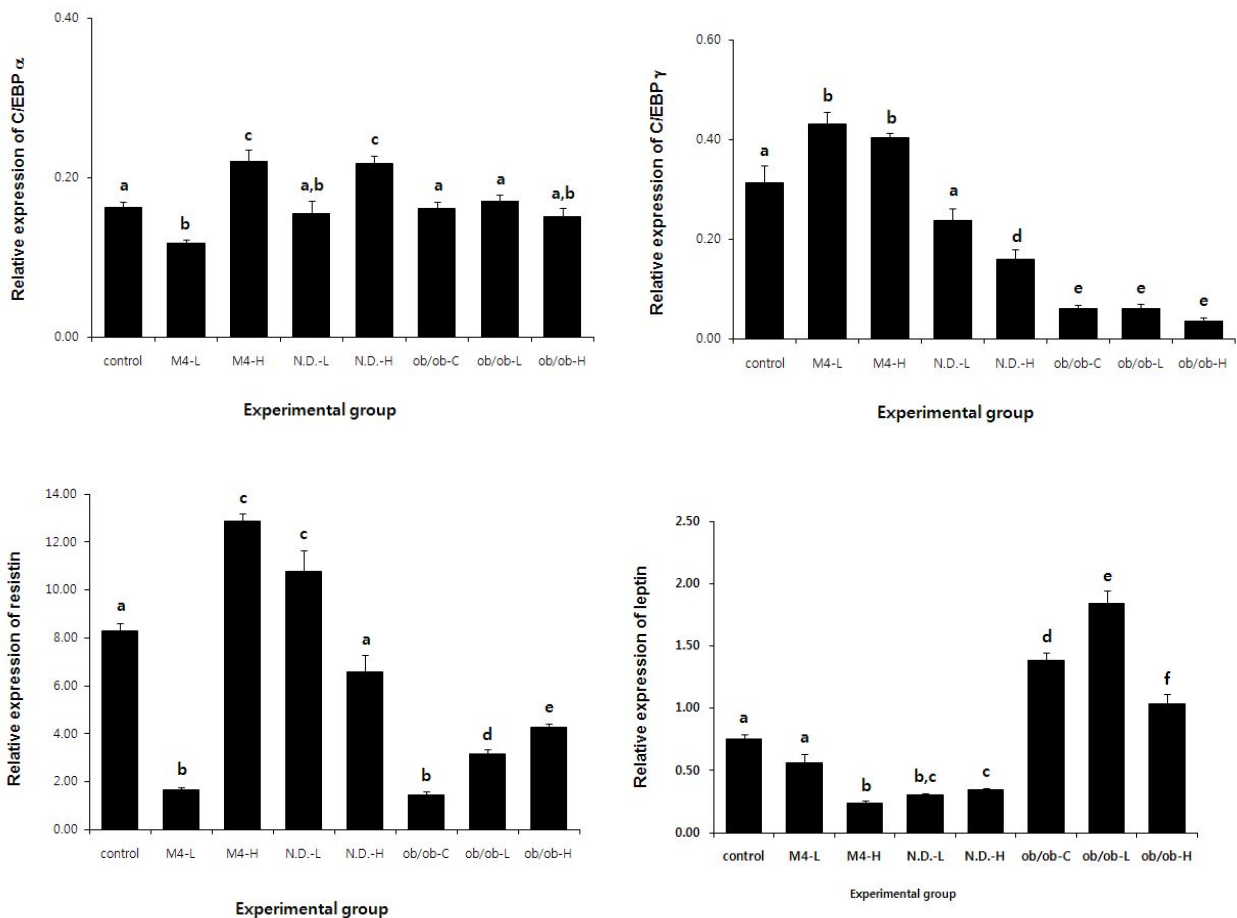
본 연구결과는 low M4를 처리하였을 때 내장 지방 세포의 분화와 증식에 관여하는 유전자의 발현이 증가하고 정상 mouse와 비교하여 Ob/Ob knockout mouse의 내장 지방 세포에서는 이 유전자의 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었음.

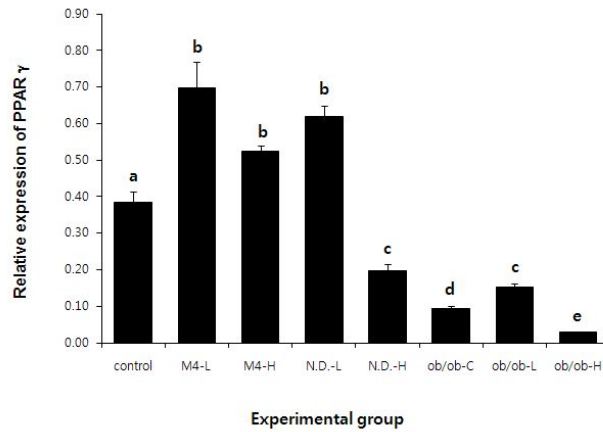
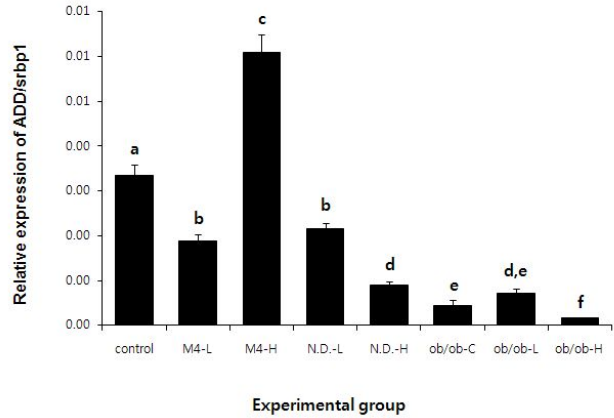
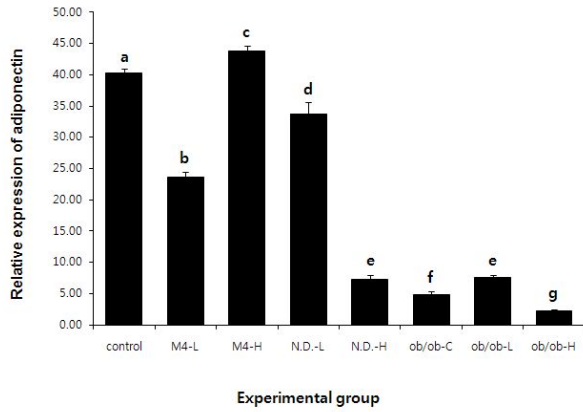
3) 돼지 정소-추출 스테로이드가 부정소 지방에서 지방 증식과 분화에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향

돼지 정소 스테로이드 추출물 M4가 부정소 지방의 증식과 분화에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 연구하기 위하여 추출물과 Nandrolone을 정상 쥐와 Ob/Ob knockout 쥐에 2주 동안 피하 투여한 부정소 지방을 채취한 후 Total RNA isolation solution을 사용하여 total RNA를 추출하였으며, UV spectrophotometer를 사용하여 추출된 total RNA의 농도를 측정하였고 agarose gel에서 RNA의 상태를 확인하였음.

각 실험군 부터 추출된 total RNA로부터 cDNA를 합성한 후 real-time PCR 기법을 사용하여 지방 증식과 분화에 관여하는 것으로 알려진 유전자의 발현 양상을 비교, 분석하였음. Real-time PCR에서 internal control로써 GAPDH를 사용하였고, 또한 대조군 (ethanol 처리군)에서 각 유전자의 발현을 실험군과 비교함으로써 돼지 정소-추출 스테로이드의 투여에 따른 유전자 발현 변화를 알아보았음.

Real-time PCR에 의해 유전자 발현을 알아보기 위한 primer sequence와 PCR condition에 대한 정보는 <표 2>에 정리되어 있음.





- (가) C/EBP alpha 유전자의 발현은 low M4 처리군에서 감소한 것을 보여주었으며 high M4 처리군과 high ND 처리군에서 유전자 발현이 증가하는 것을 알 수 있었음. Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 C/EBP alpha 유전자의 발현은 정상 쥐와 다르지 않았으며 M4의 처리는 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 C/EBP alpha 유전자의 발현에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었음.
- (나) C/EBP gamma 유전자의 발현은 2개의 M4 처리군에서 증가한 것을 알 수 있었으며 low ND 처리군에서는 유전자 발현에 변화가 없었음. high ND 처리군에서 C/EBP gamma 유전자의 발현은 감소하였으며, 특히 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 C/EBP gamma 유전자의 발현이 매우 낮게 발현되는 것을 알 수 있었음. 그러나 C/EBP alpha 유전자 발현과 유사하게 돼지 정소-추출 스테로이드의 처리는 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 C/EBP gamma 유전자의 발현에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었음.
- (다) low M4 처리군에서 Resistin의 유전자 발현은 매우 감소하는 것을 보여주었으나 high M4와 low ND 처리군에서는 발현양이 매우 증가하는 것을 알 수 있었음. Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 resistin 유전자 발현은 정상 쥐에 비교하여 매우 낮으나 M4를 처리하였을 때 처리한 양에 비례하여 resistin 유전자의 발현양이 증가하는 것을 알 수 있었음.
- (라) leptin 유전자의 발현은 high M4 처리군과 2개의 ND 처리군에서 매우 감소한 것을 알 수 있었음. Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 leptin 유전자의 발현양은 정상 쥐의 부정소 지방 세포에서보다 매우 증가하였으며 M4를 처리하였을 때 control군보다 발현양이 더

증가하는 것을 보여주었음.

- (마) adiponectin의 발현은 high M4를 처리하였을 때 증가하였으나 나머지 실험군에서 감소하는 것을 보여주었음. 특히 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 adiponectin의 발현양은 control mouse의 부정소 지방세포에서의 약 1/4 정도였으며 low M4를 처리하였을 때 발현양이 더 감소하는 것을 나타냈음.
- (바) ADD/srbp1의 유전자 발현은 adiponectin 유전자 발현 양상과 비슷하게 high M4를 처리하였을 때만 control군보다 더 증가하였으며 나머지 실험군에서는 더 감소하는 것을 나타냈음. 특히 Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서는 그 발현양이 정상 mouse보다 매우 낮았으며 adiponectin에서와는 달리 high M4를 처리하였을 때 ADD/srbp1의 유전자 발현이 감소한 것을 나타냈음.
- (사) PPAR gamma 유전자의 발현은 2개의 M4 처리군과 low ND 처리군에서 증가하였으며 high ND를 처리한 실험군에서 발현양이 감소하는 것을 보여주었음. Ob/Ob knockout mouse의 부정소 지방 세포에서 PPAR gamma 유전자의 발현은 control mouse에 비교하여 급격히 감소하였으나 처리한 M4의 농도에 따라 PPAR gamma의 유전자 발현양이 변화하는 것을 알 수 있었음.

본 연구결과를 통해 지방 증식과 분화에 관련되는 주요 유전자의 발현 양상은 내장 지방 세포와 부정소 지방 세포에서 서로 다르게 나타나며 M4의 처리에 따른 유전자의 발현 변화의 양상은 두 지방 세포에서 차이가 있음을 알 수 있었음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성도 (%)	기술개발 내용
1차 연도 (2008 - 2009)	제1세부과제: 정소 내 돼지 특이 스테로이드의 최적 분리 및 정제 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> 대량 생산 및 상품화를 위한 분리 및 정제 기술의 최적화, 호르몬 분석기술의 표준화 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> 추출량, 순도, 조성 및 경제성을 고려한 분리, 정제 조건 확보 스테로이드의 정량, 정성 분석기술의 표준화
	제1협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> In vitro 연구를 통한 돼지특이스테로이드 함유 물질이 면역 활성화에 미치는 영향 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 면역세포(T 림프구, B 림프구)의 증식 및 항체 생성에 미치는 연구 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 T 림프구의 cytokine 분비에 미치는 연구 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 T 림프구의 세포 주기에 미치는 연구
	제2협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 간세포 및 암컷 생쥐를 이용한 독성과 난소기능에 미치는 영향 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> 간에서의 세포 독성분석 조직학적 분석 발정주기에 미치는 영향 분석 임신유지에 미치는 영향 분석
	제3협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포에 미치는 영향 분석 돼지 정소-추출 스테로이드가 간질세포에 미치는 영향 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 동물지방세포주 (3T3-L1)를 이용, 돼지 정소-추출 스테로이드가 지방세포의 분화와 증식에 미치는 영향 연구 숫쥐의 간질세포(Leydig cell) culture를 이용한 돼지 정소-추출 스테로이드의 안전성과 스테로이드합성관련 유전자에 미치는 영향 연구

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	기술개발의 내용
2차 연도 (2009 - 2010)	제1세부과제: 정소 내 돼지 특이 스테로이드의 최적 분리 및 정제 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 약제화 기술 개발 및 임상연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 약제화에 필요한 최적 조건 확립 ▪ 임상연구를 통한 상품화 가능성 검증
	제1협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석 및 면역치료 요법 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 돼지 정소-추출 스테로이드가 싸이토카인의 신호전달에 미치는 영향 분석 ▪ 면역치료 요법의 동물 모델 정립을 위한 GVHD (Graft versus host disease) 동물 모델 확립
	제2협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 생쥐 배아의 착상 시 수반되는 자궁의 변화, 착상 이후 배아 발생, 젖샘의 발달에 미치는 영향 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 배아의 착상 시 수반되는 자궁의 분화 연구 - 탈락막 신호에 의한 자궁 내막 반응 - 탈락막 분화 ▪ 착상 이후 배아 발생에 관한 연구 ▪ 젖샘의 발달에 미치는 영향 연구
	제3협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 숫생쥐의 번식력에 미치는 영향 분석 ▪ 성장 과정 중 숫쥐의 정소와 부정소에 미치는 영향 연구 ▪ 전립선에 미치는 영향 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 숫생쥐의 정자 생성수와 번식력의 분석 ▪ 정소와 부정소의 형태학적 변화 연구 ▪ 정소 내 스테로이드 호르몬 농도 변화 탐색 ▪ 정소 내 스테로이드 합성 관련 유전자의 발현 변화 탐색 ▪ 전립선의 형태학적 변화와 유전자 발현 변화 탐색

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	기술개발의 내용
3차 연도 (2010 - 2011)	제1세부과제: 정소 내 돼지 특이 스테로이드의 최적 분리 및 정제 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> 임상 시험 및 산업화 	100	<ul style="list-style-type: none"> 약품의 임상 검증 대량 생산기술 연구 상품화 연구 시장성 연구
	제1협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 면역계에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 특이스테로이드 함유 물질의 생체 내 지속 투여 시 면역 활성에 미치는 영향 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 정소-추출 스테로이드 함유물질의 투여에 따른 Graft versus host disease (GVHD) 모델을 이용한 분석
	제2협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 여성 생식소, 조혈줄기세포 및 젖샘 상피발달에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 특이스테로이드 함유 물질이 조혈줄기세포의 활성 유도에 미치는 영향 및 의학적 가치성 창출 	100	<ul style="list-style-type: none"> 골수 내 조혈줄기세포의 증식에 미치는 영향 분석 조혈 줄기세포의 분화 유도를 통한 적혈구 수의 변화 분석
	제3협동과제: 돼지 정소-추출 스테로이드가 남성생식과 비만에 미치는 영향 연구	<ul style="list-style-type: none"> 돼지 정소-추출 스테로이드가 비만에 미치는 영향 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> 비만 억제 효과 연구 지방 분화와 증식에 미치는 영향 연구

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Effect of an Anabolic Steroid, Nandrolone Decanoate, on Aquaporin 1 and 9 Gene Expression in the Rat Epididymis	서희정	이기호	강효진, 최인호, 전용필	Reproductive and Developmental Biology	33(1):55-61	국내	비SCI
	Expressional comparison of glucose cotransporter isoforms in the rat epididymis during postnatal development.	이동목	이기호	서희정, 손장욱, 이용호, 최인호, 전태훈, 전용필	Journal of Animal Science and Technology	51(6):493-502	국내	비SCI
	Androgen in the uterus: A compensation of estrogen and progesterone	전용필	전용필	이동목, 전태훈, 이기호, 최인호	Development and Reproduction	13(3):133-143	국내	비SCI
2010	Molecular cloning and expression analysis of pig lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223)	김전수, 김상훈	전태훈	최인호, 전용필, 이기호, 이동목	Veterinary Immunology and Immunopathology	133:	국외	SCI
	Expressional profiling of connexin isoforms in the initial segment of the male reproductive tract during postnatal development.	서희정	이기호	손장욱, 최인호, 전용필, 전태훈	Reproductive and Developmental Biology	34(2):103-109.	국내	비SCI
	Feeding effect of an anabolic steroid, nandrolone, on the male rat testis.	이동목	이기호	민태선, 최인호, 전용필, 전태훈, 박창식	Asian-Australasia n Journal of Animal Sciences	23(12):1566-1577.	국내	SCI
	Effects of Anabolic Steroids of Pork on Proliferation and Differentiation of Myogenic Satellite Cell	이동목	최인호	전용필, 전태훈, 이기호	Korean Journal for Food Science of Animal Resources	30(5):842~850	국내	SCI
2011	Non-disturbing of Decidual Response by Steroid Hormonal Complexes of Pig Testis	유자현	전용필	변지현, 전소라, 이동목, 전태훈, 이기호, 최인호	Korean Society of Developmental Biology	15:53-59	국내	비SCI
	Expressional Profiling of Telomerase and Telomere-Associated Molecules in the Rat Testis and Seminal Vesicle during Postnatal Developmental Period.	서희정	이기호	이성규, 백행운, 전용필, 전태훈, 최인호	Journal of Animal Science and Technology	53(3)	국내	비 SCI
	Porcine testicular extract inhibits T cell proliferation through inhibition of antigen presentation mechanism	이한영	전태훈	최인호, 전용필, 이기호, 이동목	Journal of Ethnopharmacology	투고 중	국외	SCI
	The effect of IL-17A on the cell surface expression and cytokine profile of C2C12	김상훈	전태훈	최인호, 전용필, 이기호, 이동목		준비 중		
	Pig-Testis Extracted Steroid-complexes improve the Index of Anemia in Female Mice	유자현	전용필	김민희, 전소라, 변지현, 이동목, 전태훈, 이기호, 최인호	Endocrinology	투고중	국외	SCI

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	정소 추출물을 포함하는 질병 치료 또는 예방용 조성물	영남대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0035625					
2009	정소 추출물을 함유하는 면역세포 증식 억제제	영남대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0096976					
2009	폐지 정소 추출물 M1을 함유하는 빈혈질환 예방 및 치료용 조성물	영남대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0134423					
2009	폐지 정소 추출물 M2을 함유하는 빈혈질환 예방 및 치료용 조성물	영남대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0134424					
2010	정소 추출물을 유효성분으로 함유하는 창상 치료용 약학조성물	영남대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0028339					
2010	정소 추출물을 포함하는 질병 치료 또는 예방용 조성물	영남대학교 산학협력단		PCT/KR2010/002438					
2010	정소 추출물을 유효성분으로 포함하는 빈혈질환 치료 또는 예방용 약학조성물	영남대학교 산학협력단		PCT/KR2010/002514					

3. 실용화·산업화 방향 및 계획

가. 실용화·산업화 방향

약품명	용도	투여형태	대상	투여방법
빈혈 치료제	혈 내 적혈구 수 증대	tablet 형태	적혈구수 감소로 인한 빈혈 환자	일시적 경구 투여
피부 노화 방지제	피하 근육 및 피부의 탄력성 회복	크림 형태	갱년기 이후의 남성 및 여성	원하는 신체 부위에 바르는 형태

나. 실용화·산업화 계획

- (1) 빈혈치료제 : 현재 빈혈치료효과에 대한 특허가 출원되었고, 기업과 연계하여 상업화를 준비하는 단계이다.
- (2) 피부 노화 방지제 : 현재 피부 노화 방지에 대한 특허 출원을 준비하고 있으며, 이를 본격적으로 산업화하기 위한 기업을 물색하고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

- 양경미, 김미림. 2006. 건강과 질병치료 효능 증진을 위한 한방영양과 현대영양관리의 비교. J Korean Soc Food Sci Nutr 35:1106-1114.
- Blasberg ME, langan CJ, Clark AS. 1997. The effects of 17 alpha-methyltestosterone, methandrosteneolone, and nandrolone decanoate on the rat estrous cycle. Physiol Behav 61:265-272.
- Buchler T. 2011. Therapeutic equivalence and effectiveness of Binocrit (HX575) in patients with anemia caused by chemotherapy. Klin Onkol 24:147-148.
- Cardozo CP, Qin W, Peng Y, Liu X, Wu Y, Pan J, Bauman WA, Zaidi M, Sun L. 2010. Nandrolone slows hindlimb bone loss in a rat model of bone loss due to denervation. Ann N Y Acad Sci 1192:303-306
- Parr MK, Flenker U, Schanzer W. 2010. Sports-related issues and biochemistry of natural and synthetic anabolic substances. Endocrinol Metab Clin North Am 39:45-57.
- Chawla B, Iqbal FM, Chawla MS. 2009. Nandrolone decanoate for the treatment of erythropoietin refractory anemia: a case series. Compr Ther 35:199-203.
- Durmaz O, Demirkaya M, Sevinir B. 2011. Recombinant human erythropoietin β : the effect of weekly dosing on anemia, quality of life, and long-term outcomes in pediatric cancer patients. Pediatr hematol Oncol [Epub ahead of print].
- Lee DM, Lee KH, Cheon YP, Chun T, Choi I. 2010. Effects of Anabolic Steroids of Pork on Proliferation and Differentiation of Myogenic Satellite Cell. Korean J Food Sci Ani Resour 30:842~850.
- Locatelli F, Del Vecchio L. 2011. New erythropoiesis-stimulating agents and new iron formulations. Contrib Nephrol 171:255-260.
- Macdonald JH, marcora SM, Jibani MM, Kumwenda MJ, Ahmed W, Lemmey AB. 2007. Nandrolone decanoate as anabolic therapy in chronic kidney disease: a randomized phase II dose-finding study. Nephron Clin Pract 106:c125-c135.
- Sheashaa H, Abdel-Razek W, El-Husseini A, Selim A, Hassan N, Abbas T, El-Askalani h, Sobh M. 2005. Use of nandrolone decanoate as an adjuvant for erythropoietin dose reduction in treating anemia in patients on hemodialysis. Nephron Clin Pract 99:c102-c106.
- Ross EV, Grossman MC, Duke D, Grevelink JM. Long-term results after CO2 laser skin resurfacing: a comparison of scanned and pulsed systems. J Am Acad Dermatol. 1997 Nov;37(5 Pt 1):709-18.
- Park JH, Choi SC, Lee JH, Lee DY. Recipient site preparation for epidermal grafting using carbon dioxide SilkTouch laser. Clin Exp Dermatol. 2010 Jun;35(4):443-4. Epub 2009 Sep 15.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 **생명산업기술개발사업**의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 **생명산업기술개발사업**의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.