

발간등록번호

11-1543000-001239-01

천연물질을 이용한 한우 수태율 향상기술 개발
(Technology Development for Increasing Fertility using
Medicinal herb in Hanwoo)

명품한우컨설팅

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “천연물질을 이용한 한우 수태율 향상기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016 년 3 월 21 일

주관연구기관명 : 명품한우컨설팅

주관연구책임자 : 박 정 준

세부연구책임자 : 박 정 준

연 구 원 : 이 선 구

연 구 원 : 윤 필 상

연 구 원 : 유 한 준

연 구 원 : 김 기 원

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 정 배 동

연 구 원 : 길 용 범

연 구 원 : 박 소 연

협동연구기관명 : 대구대학교

협동연구책임자 : 구 덕 본

연 구 원 : 김 진 우

연 구 원 : 박 수 용

연 구 원 : 채 성 규

요 약 문

I. 제 목

연구과제명 : 천연물질을 이용한 한우 수태율 향상기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	수 상
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	1	1	3	10		1	1	1				1	
달성실적	4	0	7	9	29	0	20	0		1		0	2

III. 연구개발의 목적 및 필요성

원인이 불분명한 저수태우에서 천연물질에 의한 자궁 내 미생물 변화를 번식생리학적, 번식면역학적, 미생물학적 측면에서 비교 분석하여 배아착상 및 임신유지에 이상적인 자궁 내 조건을 제시하고, 이를 바탕으로 높은 수태율을 위한 한우의 자궁 내 환경 조성 방법을 개발하고자 한다. 또한 본 연구에서 개발된 자궁 미생물 억제제는 한우 및 유우의 번식능력을 향상시킴으로써 축산농가의 수입 증대에 기여할 것이라고 생각된다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 저수태우와 정상번식 한우로부터 자궁 내 미생물 채취 및 분석
2. 저수태우의 혈중 estrogen, progesterone 농도 및 자궁내 초음파 분석
3. 최종선발된 황백 및 환삼덩굴의 추출물 제작
4. 황백 및 환삼덩굴 추출물 처리에 의한 한우 체외수정란의 발생 효율 검증
5. 황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 분리균에 대한 항균능력 검증
6. LPS 및 HCL 투여에 의한 자궁내막염 마우스 모델 개발
7. 자궁내막염 및 염증반응에서 황백 및 환삼덩굴 추출물의 효과 검증
8. 황백 및 환삼덩굴 추출물에 의한 번식생리학적 효과 검증
9. 황백 및 환삼덩굴 추출물에 의한 미생물학적 효과 검증
10. 최적의 자궁 미생물억제제로써의 황백 및 환삼덩굴 제안
11. 황백 및 환삼덩굴 추출물을 이용한 인공수정과 수정란이식 시 수태율 향상 효과 분석

V. 연구개발결과

1. 한우의 자궁 및 정액 내에는 무균상태이어야 함에도 불구하고 많은 개체에서 다양한 균이 검출되었다. 게다가 미경산 한우, 정상 한우 그리고 번식장애 한우의 자궁 세척액과 인공수정용 정액 내 세균의 분포는 서로 다른 양상을 나타냈다.
2. 저수태우에서 발견된 12종의 균 중 병원성이 보고된 균은 5종이 발견되었다. 정액의 경우 13종의 균이 발견되었으며 병원성이 보고된 균은 4종으로 확인되었다. 발견된 균들의 생리학적 기능은 불분명하지만 일부 균은 수태율을 감소시키는 원인으로 작용할 수 있다. 예를 들면 생식기를 통해 *Escherichia coli*와 같은 병원성 세균에 감염되면 자궁의 방어기전에 관여하는 다형핵 호중구(Polymorphonuclear neutrophils, PMNs)가 자궁 내로 유입되어 면역 체계 반응을 개시하게 되며, 염증 반응이 발생하면 사이토카인의 분비로 인해 정상적인 임신 관련 호르몬의 합성을 방해하여 수태율을 감소시킬 수 있다.
3. 항균성 시험 천연물질로 한약재 또는 야생초인 황백, 환삼덩굴, 제비꽃, 홍화, 백굴채를 사용하였으며, 이 중 황백과 환삼덩굴의 항균효과가 가장 뛰어났다.
4. 황백은 한우의 자궁 세척액 및 정액에서 분리된 20종의 균 중 총 19종의 균에 대하여 항균효과를 보였다. 또한 항균효과가 가장 우수했으며, 농도가 높아짐에 따라 항균효과도 증가되는 양상을 나타냈다.
5. 환삼덩굴의 항균효과는 황백보다는 비교적 효과가 떨어졌지만 대부분의 균에 대해 항균효과를 나타냈고, 자궁 세척액과 정액 내에서 가장 높은 빈도로 분리된 주요 3가지 균에 대해서 다른 추출물에 비해 높은 항균효과를 보였다.
6. 본 연구에서 우수한 항균효과를 보인 황백과 환삼덩굴 추출물은 특정 세균이 아니라 자궁 내 분리된 모든 세균총에서 우수한 항균효과를 나타내었고, 더욱이 자궁 내 분리 세균 중, 소에게 병원성을 나타낼 수 있는 *S. uberis*나 *E. rhusiopathiae*에 대해서도 황백은 우수한 항균효과가 있었고 환삼덩굴은 *S. uberis*에 우수한 항균효과를 보였다.
7. 황백과 환삼덩굴 추출물을 0.01 µg/ml 농도로 수정란에 첨가한 결과 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발생율은 대조군보다 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 추출물 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포 수는 증가하였고, 세포사멸지수는 감소하는 경향을 보여 주었다.
8. 조직학적 스코어를 통해 HCl을 먼저 자궁내 투여후 LPS를 자궁내 4회 투여하는 경우가 자궁내 염증을 더 유발하는 것으로 나타났으며 이 결과는 기존의 LPS를 자궁내 또는 복강내 투여하는 경우보다 HCl을 전투여 한 후 LPS를 자궁내 투여하는 경우가 자궁 염증 모델로써 적합하다는 것을 밝혔다.
9. HCl을 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하여 임상적 소견을 스코어하였을 때 염증정도가 11정도를 나타냈지만 황백(PC-PID)과 환삼덩굴(HJ-PID)를 전투여 하였을 경우 염증스코어가 5에서 6 또는 2에서 4정도로 감소하는 것으로 조사되었다.
10. HCl을 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하면 자궁 내 염증 유도 단백질 IL-1β와 TNF-α의 발현이 유도되는 것을 확인하였으며 황백과 환삼덩굴을 전 처리 하였을 경우 IL-1β와 TNF-α의 발현이 감소하는 것으로 나타났다.
11. 체외배양 시 환삼덩굴과 황백 추출액을 각각 처리한 결과, 처리군에서의 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발달율은 대조군보다 유의하게 높게 나타남을 확인하였다. 또한 환삼덩굴과 황백을 함께 처리하였을 때에는 항산화제로 알려진 멜라토닌과 유사한 결과를 볼 수 있었다.
12. 체외배양 시 환삼덩굴과 황백 추출액을 처리한 뒤 세포사멸지수와 세포사멸 유전자의 발현이 감소함으로써 배반포의 질적 수준이 향상됨을 확인하였고, ROS의 생성이 감소하는 것을 대조군과 비교 분석하여 확인하였음. 또한, 환삼덩굴과 황백 추출액을 함께 처리하였을 때, ROS 생성수준 및 세포사멸 지수가 가장 유의적으로 감소하였으며, 이는 항산화제인 멜라토닌 처리와 비슷한 효과를 확인하

였다.

13. 한우 수정란의 체외발달과정 동안 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 첨가는 배반포로의 발달 효율, 한우 수정란의 난할율 및 생산된 배반포의 질적 수준의 향상시킨다는 것을 확인하였음. 따라서 황백과 환삼덩굴 추출액의 처리는 한우 수정란의 난 분할율 증가와 배반포로의 발달효율을 지속적으로 향상시키는데 있어서 긍정적인 효과를 보여주었다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 자궁 내 미생물 감염에 의한 한우 번식장애 시 자궁 미생물억제제에 의한 극복 및 수태율 증진 효과
2. 자궁 미생물환경 개선에 의한 수태율 증진효과로 한우 생산비용 절감과 경쟁력 확보
3. 자궁 미생물환경 개선에 의한 수정란이식 효율증가로 한우의 품종개량 및 대량생산
4. 쇠고기 수입자유화에 대비한 한우 및 유우 경쟁력 증진효과
5. 천연물질 추출물을 이용한 한우 체외수정란의 생산과정 동안 배양 환경 개선을 통해 이식 가능한 수정란의 지속적이고 안정적 생산에 활용하고자함
6. 항산화적 효과를 이용한 천연물질의 ROS 제거능력을 검토하고, 이를 통한 한우 초기배의 생산효율 및 질적 수준 향상에 있어서 원인규명에 대한 기본 연구로써 활용하고자 함
7. 안전축산물
 - 소비자들의 요구와 맞물려 무항생제, 유기축산, 친환경축산, HACCP 등의 제도가 권장되고 있는 현실에서 본 연구는 인체 및 가축에도 무해한 한방요법을 활용함으로써 황백, 환삼덩굴을 이용하여 안전성이 확보된 항생제 대체물질을 개발하고 현장에 적용하고자 함
8. 젓소 무항생제 인증
 - 자궁세척을 통하여 수태율 증진, 제4위 전위예방 등 산과질병을 예방할 수 있으나, 현재까지 생산된 자궁세척제, 자궁내막염 치료제는 항생제를 이용한 것으로 원유의 무항생제 인증 또는 잔류 항생물질과 같은 남유에 부정적인 영향을 가져옴으로써 농가소득을 저하시킴. 본 연구의 제제는 무항생제의 한방제제 등을 활용하여 위와 같은 문제를 해결하고 낙농가의 소득증대에 기여하고자 함
9. 수정란 이식 수태율 증진
 - 국내 평균적인 수태율이 50% 이상 상회하지 못하는 이유 중 하나로 현재까지 자궁 내 무균이라는 개념으로 이식이 실시되었으나, 본 연구결과와 같이 자궁 내에는 다양한 미생물이 있는 것으로 확인이 됨. 미생물의 영향으로 수태율이 상승되지 못하는 측면이 있을 것으로 생각되며, 본 연구에서 개발될 제품으로 수태율이 증진된 결과를 토대로 번식농가의 수태율 향상을 기대함
10. 저렴한 수태율 증진보조제 활용
 - 본 제제를 제작한 후, 인공수정 또는 수정란 이식 2~3일 전에 자궁 내 주입을 실시하여 현재의 수태율(약 60% 또는 40%) 보다 약 10~15% 증진될 것으로 기대함. 본 제제를 농가에서 쉽게 사용할 수 있도록 하여 기술이전 후 두당 5,000원의 시장가격으로 누구나 손쉽게 사용할 수 있는 제품으로 활용

SUMMARY

(영문요약문)

I. Purpose and the need for research and development

Cause breeding physiological changes in the microorganisms in the uterus by an repeat breeder, breeding immunological, their terms and conditions of the ideal in the uterus and comparative analysis from the microbiological aspects to the maintenance of pregnancy and embryo implantation and, this is trying to develop a method of intrauterine environment creation of Korean beef for the high conception rate in the foundation. In addition, the uterus microbial agents that have been developed in this study, to improve the reproductive performance of beef and dairy cattle, are believed to contribute to the increase of the income of livestock farmers.

II. The contents and scope of the research and development

1. Repeat breeder, normal breeding cattle and microorganism-collecting in the uterus
2. Blood estrogen, progesterone concentration and intrauterine ultrasound analysis
3. The final selection has been extract of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* production
4. Verification of the efficiency of generation of in vitro fertilized embryos by the *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts
5. Verification of antibacterial activity on the uterus in the isolates of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts
6. Development of a mouse model of endometriosis by LPS and HCL administration
7. Verification of the effect of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts in endometritis and inflammatory reaction
8. Verification of breeding physiological effect by *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts
9. Verification of microbiological effects of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts
10. Analysis of the conception rate improvement effect at the time of artificial insemination and embryo transfer with a *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts

III. The results of research and development

1. Even though if it is not sterile state in the uterus and the semen of Hanwoo, in a

number of objects, a variety of bacteria has been detected. In addition, bacteria of the distribution of the semen for normal cow and uterus cleaning solution and artificial insemination of reproductive disorders showed a different aspect.

2. Bacterium pathogenic was reported in 12 species of bacteria found in repeat breeder was discovered five. If semen is found 13 species of bacteria, fungi pathogenic is reported, it was confirmed in four. Physiological function of the discovered bacteria, is unknown, some bacteria can act as a cause of reducing the conception rate. For example, if infected with pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* through the genital, polymorphonuclear neutrophils are involved in front of the uterus of a defense mechanism (Polymorphonuclear neutrophils, PMNs) is flowing into the uterus, the immune system will initiate a reaction of the inflammatory reaction occurs, it is possible to reduce the conception rate by inhibiting the synthesis of normal pregnancy related hormone for secretion of cytokines.
3. *Phelledendron amurense* showed antibacterial effect against all 19 species of bacteria of the 20 species of bacteria that has been separated from the uterus cleaning fluid and semen. In addition, a most excellent antibacterial effect, showed the aspect that also increases the antimicrobial effect as the concentration increases.
4. *Humulus japonicus* is relatively effective than *Phelledendron amurense*, shows antimicrobial effect against most bacteria, the major three bacteria were isolated most frequently in the womb cleaning fluid and semen, It showed higher antimicrobial effect than other extracts.
5. In this study, excellent *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts showed antibacterial effect was, rather than the specific bacteria, shows a superior antibacterial effect of all of the bacterial flora that are separated in the uterus, still in the womb in the separation bacteria in, *Phelledendron amurense* in *S. uberis* and *E. rhusiopathiae* that can indicate pathogenicity in cattle, is *Humulus japonicus* there is an excellent antimicrobial effect showed the antimicrobial effect with excellent *S. uberis*.
6. As a result of addition of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extract the fertilized egg at a concentration of 0.01 mg/ml, Treatment groups has been similar to the control group, the incidence of the blastocyst is displayed higher than the control group that's could be confirmed. Further, extract-treated total cell count of the produced blastocysts group increases, cell death index showed a tendency to decrease.
7. Histological scores initially after intrauterine administration of LPS-HCl using be administered 4 times in uterus was found to induce. This result is than when administered intrauterine or intraperitoneally conventional LPS, after the HCl, if the LPS administration within the uterus revealed that are suitable as inflammation model the uterus.
8. After administration of HCl, and administered 4 times LPS at 2 hour intervals, although the degree of inflammation when the clinical findings were scored showed

the extent 11, and *Phelledendron amurense*(PC-PID), *Humulus japonicus*(HJ-PID) on combat it was found that inflammation score is reduced to about 5-6 or 2-4.

9. After administration of the HCl, the administration of 4 times LPS at 2-hour intervals, before processing the *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* has confirmed that the expression of inflammation-inducing protein IL-1 β and TNF-a in the uterus is induced If the expression of IL-1 beta and TNF-a was found to be decreased.
10. The results during the in vitro culture *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extract were treated respectively, cleavage rate in the treatment group, were similar to the control group, it to the blastocyst is displayed significantly higher than the control group it was confirmed. Furthermore, when treated with *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* together can be seen the results shown in melatonin, known antioxidants.
11. After processing the in vitro culture during *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts, by the expression of cell death and the cell necrosis gene is reduced, that the qualitative level of the blastocyst is sure to improve, ROS generation of decreases that was confirmed by a comparative analysis with the control group. Also, when treated with *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts are combined, reduced most significantly the generation level and cell death ROS, which may contain anti-oxidants, to confirm the same effect as melatonin treatment.
12. During in vitro development process of fertilized egg, the addition of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* is a natural substance, development efficiency to the blastocyst, qualitative of cleavage rate and productivity blastocysts of fertilized egg it was confirmed that the increase of the levels. Therefore, treatment of *Phelledendron amurense*, *Humulus japonicus* extracts showed a positive effect in terms of continuously improve the development efficiency to increase and blastocyst of fertilized egg.

IV. Research results and outcomes utilization plan

1. Overcome the conception rate improvement effect of the uterus-microbial agents at the time of cattle reproductive disorders due to intrauterine microbial infection
2. Ensure the reduction and competitiveness of the production cost in conception rate improvement effect by improving the uterine microbial environment
3. Mass production and breeding to increase the embryo transfer efficiency by improving the uterine microbial environment
4. Effect of strengthening the competitiveness of Korean beef and dairy cows with beef import liberalization
5. In the process of production natural substance extract in vitro fertilized eggs using through the improvement of the culture environment to try to take advantage of the

continuous and stable production of portable fertilized egg

6. Consider the ROS removal capability of the natural substance that utilizes an anti-oxidative effect, trying to take advantage of as a basic research for the causes in the improvement of production efficiency and quality of early embryo
7. Safety livestock products
 - : Antibiotic-free mesh with the needs of the consumer, organic livestock, environmentally friendly animal husbandry, from reality systems such as HACCP has been recommended, in this study, also in the human body and livestock to take advantage of the harmless herbal therapy, developed an antibiotic alternative substances that safety is ensured, to be applied in the field
8. Cow antibiotic-free
 - : Improve conception rate through the uterus cleaning, you can prevent the disease, such as fourth largest potential prevention, produced to date uterine cleaning agents, the treatment of endometriosis, which was using the antibiotic , by acquiring the lead oil negative effects such as authentication and antibiotic residues of antibiotic-free of crude oil, to reduce the income of farmers. The formulations of the present study is to take advantage of the herbal preparations such as antibiotic-free, to solve the problem as described above, and try to contribute to the dairy farmers of the income increase
9. Improve embryo transfer conception rate
 - : One of the reasons why national average conception rate can not exceed more than 50%, although implanted in the concept of intrauterine sterile were conducted to date, like the results of this study, different in utero It confirms that there are microorganisms have been. Is likely a side conception rate is not increased by the influence of microorganisms, to expect the conception rate improving breeding farms based on the result of conception rate was promoted by the products to be developed in this study
10. Take advantage of the supplements to improve conception rate at an affordable price
 - : After preparing this formulation, those artificial insemination, or to implement the intrauterine injected into fertilized egg transplant a couple of days ago, to increase about 10% to 15% than the current conception rate (about 60% or 40%) I expected to. Anyone get the easy product that can be used at 5,000 won of market price per head after the transfer of technology and to make it easier to use this formulation from farmers

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Summary & Goal -----	11
1. Necessity -----	11
2. Aim -----	11
3. Products -----	12
Chapter 2. Current status of international/domestic technology development -----	13
1. Domestic trends -----	13
2. International trends -----	13
Chapter 3. Research contents and results -----	15
1. Collection bacteria in the uterus and field test using medicinal herb -----	15
2. Isolation and identification of bacteria, and anti-inflammatory effects in endometritis model -----	32
3. Safety tests for gamete cells of medicinal herb -----	59
Chapter 4. Fulfillment rate to plan and contribution rate to the related fields -----	66
1. Fulfillment rate to plan -----	66
2. Contribution rate to the related fields -----	69
Chapter 5. Achievement & Application plan -----	70
1. Achievement -----	70
2. Application plan -----	70
Chapter 6. Safety supervision -----	72
Chapter 7. References -----	75

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 -----	11
제 1 절 연구개발의 필요성 -----	11
제 2 절 연구개발의 목적 -----	11
제 3 절 연구성과 목표 대비 실적 -----	12
제 2 장 국내외 연구 현황 -----	13
제 1 절 국내 연구 현황 -----	13
제 2 절 해외 연구 현황 -----	13
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 -----	15
제 1 절 1세부과제 연구수행 내용 및 결과 -----	15
제 2 절 1협동과제 연구수행 내용 및 결과 -----	32
제 3 절 2협동과제 연구수행 내용 및 결과 -----	59
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	66
제 1절 연구개발 목표 달성도 -----	66
제 2절 관련분야 기술발전 기여도 -----	69
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	70
제 1절 연구개발 성과 -----	70
제 2절 성과 활용 계획 -----	70
제 6 장 연구실 안전관리 이행실적 -----	72
제 7 장 참고문헌 -----	75

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 필요성

국내 축산업은 '94년 UR협상 타결 이후 한·미 FTA 협상 타결로 제2의 개방에 직면하게 되었고, 개방화의 확대 추세에 따라 수입쇠고기와의 경쟁력 확보와 웰빙시대를 맞이하여 소비자의 요구에 부응하는 품질의 향상과 차별화 전략이 요구되고 있다. 그러나 경쟁력 확보를 위하여 최근 한우 번식우의 사육형태가 대규모화 됨에 따라 개체관리 및 질병관리 미흡 등으로 인하여 무발정, 둔성발정, 미약발정 등의 발현으로 인공수정 시 첫종부 수태율이 약 50~60 %로 낮게 나타나며 이것은 인공수정 횟수, 공태기간 연장, 호르몬 제제 사용, 수의 진료 및 치료 등 경영비용을 비롯한 송아지 생산 비용의 증가와 쇠고기 품질의 저하로까지 이어져 농가 소득을 감소시키고 있다. 그러므로 지속적으로 한우에서 관찰되는 번식장애에 의한 번식효율 저하의 원인을 파악하여 분석하고 개체의 수태율 향상과 같은 번식효율을 증진시키기 위한 개선방안이 필요한 실정이다. 또한 이러한 개선방안은 국내 한우 사육농가 및 쇠고기 시장보호를 위하여 국제 경쟁력을 갖춘 고품질 한우의 안정적인 대량 생산에 도움이 될 것이다.

제 2 절 연구개발의 목적

저수태우의 자궁 미생물환경 조사를 통한 천연물질 선별 후, 인공수정과 수정란이식 시 수태율 증진 방안 확립 및 활용

목표	천연물질에 의한 한우 수태율 증진
----	---------------------------

기존의 제품	천연물질을 이용한 미생물 억제제
<ul style="list-style-type: none"> ○ 치료기간과 휴약기간이 필요 ○ 단순한 자궁 내 세척제와 소독제의 개념 ○ 수의진료 자격증이 필요 ○ 약값, 왕진비, 치료비의 비용발생 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동시적용 가능한 침가제의 개념 ○ 자궁 내 미생물 및 면역 기능의 안정화 ○ 과학적으로 안전성이 검증된 제품 개발 ○ 무항생제의 누구나 사용 가능한 제품 개발

제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

구 분	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	수 상
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표	1	1	3	10		1	1	1				1	
달성실적	4	0	7	9	29	0	20	0		1		0	2

제 2 장 국내·외 연구 현황

제 1 절 국내 연구 현황

- 한우 암소의 번식현황 조사를 통한 번식률 제고
(2009년도 시험연구사업, 농촌진흥청 축산과학원, p150)
- 자궁내막기능 또는 자궁내막기능과 관련된 기능의 개선 방법
(특허출원 1020057008617, 캠브리지 유니버시티 테크니칼 서비스 리미티드, 2005)
- 한우의 분만간격과 분만 후 번식능력에 관한 연구
(계명연구논총, 16('98.3) pp.475-488)
- 한우의 분만간격 단축과 수태율 향상방안에 관한 연구개발
(연구보고서; 94-50-0032-00-00, 농림부, 1995)
- 대구대학교 구덕본교수팀은 체내 및 체외 생산 소 배반포를 인위적인 응축을 유도하고 동결 용해 후 대리모에 이식하여 산자 생산의 효율성을 보고하였음(2014)
- 서울대학교 노상호 교수팀은 소 수정란의 체외 생산에 있어서 Activin A와 Heparin Binding-EGF의 병행 처리에 의해 배반포로의 발달율, 배반포 부화율 및 전체 세포수를 향상시킬 수 있다는 것을 보고하였음(2014)
- 경상대학교 강다원 교수팀에서는 K⁺ 채널 억제제인 Fluoxetine을 체외배양 24 시간 동안 처리함으로써 소 수정란의 배반포 발달을 향상시킬 수 있다고 보고하였음(2014)
- 강원대학교에서는 체세포 핵 치환 후 체외배양기간 동안 L-glutathione을 처리함으로써 배반포의 발달을 향상과 세포사멸을 감소시킬 수 있다는 것을 보고하였음(2014)
- 서울대학교에서는 parthenogenetic activation과 체세포 핵치환 방법을 통한 체외배양기간 동안 resveratrol과 trolox 첨가로 돼지 배아의 항산화 효과를 볼 수 있다고 보고하였음(2015)
- 대구대학교에서는 돼지 체외배양 과정 동안 천연물질인 catalpol을 처리함으로써 돼지 배반포 발달율 및 질적 수준을 향상시킬 수 있다는 것을 보고하였음(2015)

제 2 절 국외 연구 현황

- 메트리큐어 (자궁내막염 치료제, Canada)
- 자궁 내 면역세포는 성공적인 임신을 위한 필수 인자이다.
(Am J Reprod Immunol Microbiol. 1988. 16:1-7)
- 면역세포는 자궁 내 미생물을 인식하여 염증성 사이토카인의 분비와 면역 억제 사이토카인의 분비 및 감소 작용을 유발시킨다. (Biochim Biophys Acta. 2009. 1796:11-18)
- 캐나다 Robert 박사팀은 vitamin K2를 체외배양액에 처리함으로써 소 수정란에서 문제가 되는 미토콘드리아의 활성을 향상시킴으로써 궁극적으로 소 수정란의 체외 생산을 증진시킬 수 있다는 것을 보고하였음(2014)
- 이탈리아 Gasparini 박사팀은 소 수정란의 체외배양 시기에 저농도의 resveratrol을 처리함

으로써 체외생산 수정란의 질을 향상시키고 동결 효율 또한 향상됨을 보고하였음(2014)

○ 그리스 Sapanidou 등은 소 체외수정 동안 crocin을 처리함으로써 소 정자의 질적 향상을 도모함으로써 궁극적으로 배반포 생산을 증진시킬 수 있다는 것을 보고하였음(2015)

○ 이탈리아 Zullo 등은 소 수정란의 체외배양 동안 L-ergothioneine를 처리함으로써 체외생산 배반포의 질적 수준이 향상됨을 보고함(2015)

○ 터키 Aksaray University에서는 소 체외배양동안 oleic과 linoleic acids를 처리함으로써 소 배반포 발달율과 질적 수준을 향상시켰다고 보고하였음(2015)

○ 파키스탄 King Saud Univestiy에서는 양의 초기 배 발달과정에서 녹차 추출액을 이용한 항산화 효과를 통해서 배반포로의 발달효율을 향상시켰으며, 체외성숙과정에서의 성숙율 증가시킨다고 보고하였음(2014)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1세부과제 연구수행 내용 및 결과

1. 자궁 내 균 분리·동정용 샘플 채취

강원도 횡성군 개전리에 위치한 한우 사육농가의 번식우를 대상으로 샘플채취가 이루어졌으며 정상번식우, 미경산우(정상번식우), 저수태우를 대상으로 하여 채취가 실시되었다. 정상번식우는 개체기록을 토대로하여 이론적으로 정상인 발정주기를 나타내며 직검결과 자궁 및 난소에 이상이 없는 기준으로 개체들을 선정하였으며, 저수태우는 난소, 자궁, 발정주기 및 외형상으로 뚜렷한 이상징후 없이 3회 이상 수태에 실패한 개체들을 대상으로 탐색하여 선정하였다. 또한 실험에 사용된 동결정액은 한우 인공수정용 정액으로 시중에서 판매되고 있는 것들을 이용하였으며, 무작위로 15종을 선정하여 분석에 사용하였다. 자궁 세척액은 50 ml conical tube(BD Falcon, USA)에 고압 멸균된 증류수를 40 ml씩 준비하였으며, 세척액의 자궁 내 삽입과 회수를 위하여 foley balloon catheter(Rusch, Germany)를 사용하였다. 철심과 연결된 catheter는 sheath(IVM, France)로 보호된 상태에서 자궁각 부근까지 삽입된 후, sheath를 벗어나 catheter만이 자궁경을 통과하고 자궁각 부근까지 도달하여 장착이 이루어졌다. 장착된 catheter를 이용하여 자궁 세척액을 회수하기 위해 60 ml 관류용 주사기(Hwajin, Korea)를 사용하였으며, 각 주사기에 멸균증류수를 30 ml씩 담아 개체별로 자궁 세척액을 회수하였다. 회수방법은 주사기와 catheter를 연결한 후, 주사기 내의 증류수를 직접적으로 자궁 내로 주입하고, 다시 흡입시키는 방법을 사용하여 개체에 따라 1회 또는 2회 반복 채취하였다. 회수된 자궁 세척액은 50 ml conical tube에 담아 저온상태로 실험실로 운반하여 분석에 이용하였다.



그림 1. 자궁 내 미생물 채취

2. 정상번식우와 저수태우의 발정주기 동안의 Estradiol-17b(E2) 및 progesterone(P4) 분석

정상번식우 9두와 저수태우 10두로부터 호르몬 분석을 위하여 경정맥으로부터 각 10ml 이상의 혈액을 채취하여 혈장을 분리하였다. 혈액채취 간격은 승가허용 및 배란 후를 0일로 시작하여 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23일째에 각 군으로부터 10ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였으며 혈청분리 시에는 헤파린 처리된 튜브(BD vacutainer, USA)를 이용하였다. 혈장은 1,500rpm에서 15분간, 4℃에서 원심분리한 후 -20℃에서 보관하다 일괄적으로 분석하였다. Estradiol-17b(E2)와 progesterone(P4) (Diagnostic Products Corp, Los Angeles, CA, USA)의 농도 분석은

radioimmunoassay(RIA) 방법으로 3반복하여 측정하였다.

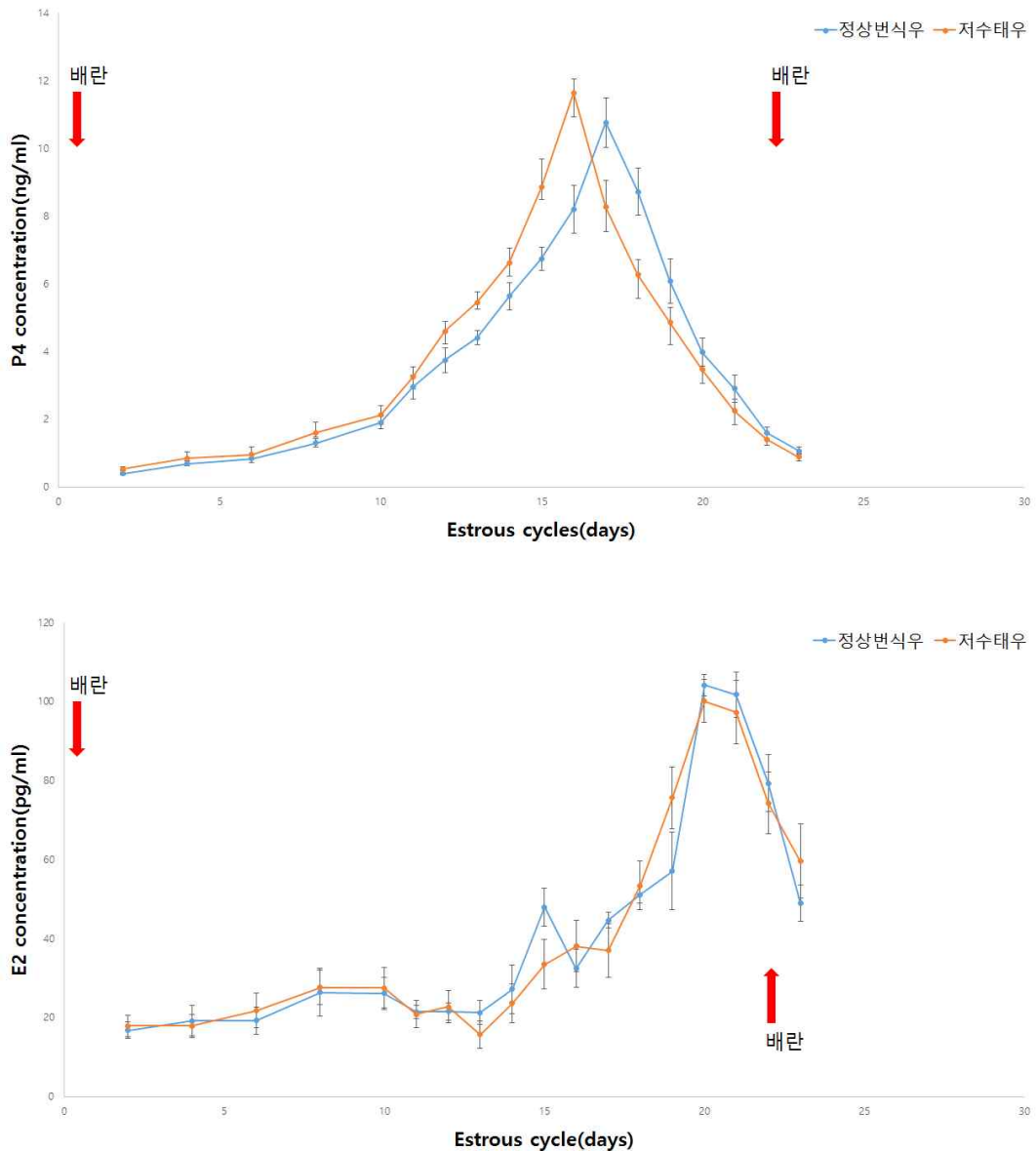


그림 2. 정상번식우와 저수태우의 발정주기동안의 P4(위)와 E2(아래)의 혈중 호르몬 농도 변화

18일간의 발정주기 동안의 호르몬 변화는 그림 2와 같다. P4와 E2의 혈중 농도의 변화량은 정상번식우와 저수태우간의 발현양상이 유사하게 관찰이 되었다. P4의 농도는 난포기를 지나 황체기부터 농도가 증가하여 약 15~17일 사이에 최대치를 보인 후 서서히 감소하는 형태로 나타났으며, E2의 경우는 약 3번의 peak가 나타나는 모습을 보여주었다.

3. 정상번식우와 저수태우의 자성생식기도관 초음파 촬영

정상번식우와 저수태우의 자성생식기도관 비교확인을 위하여 초음파 촬영(Real-time Ultrasound, 1.5-3MHz frequency, 180mm linear probe, HS-2000, FHK, Japan)을 실시하였다. 각 4두를 무작위로 선정하여 난소, 자궁경관 및 자궁을 촬영하여 초음파진단 상의 이상

유무를 판단하였다.

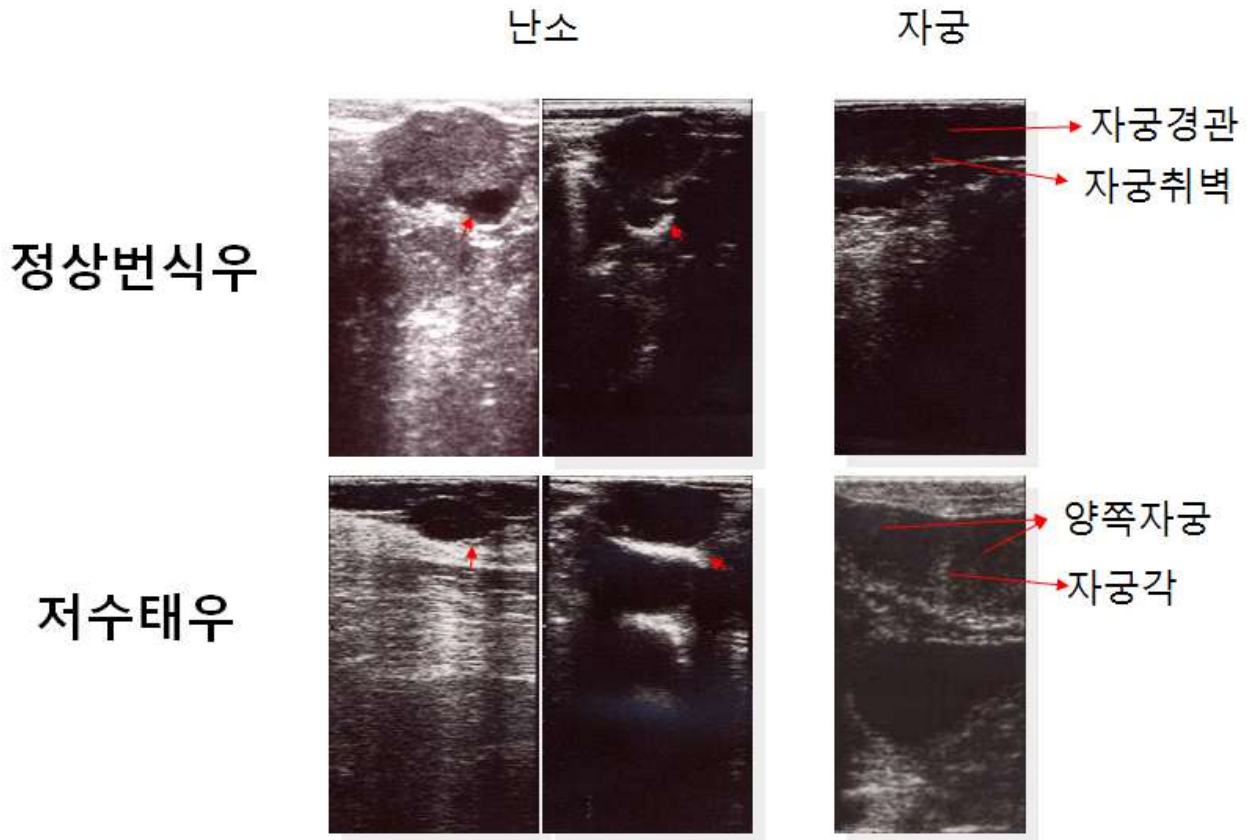


그림 3. 정상번식우 및 저수태우의 초음파 촬영사진. 위, 아래 빨간화살표: 난포 또는 황체

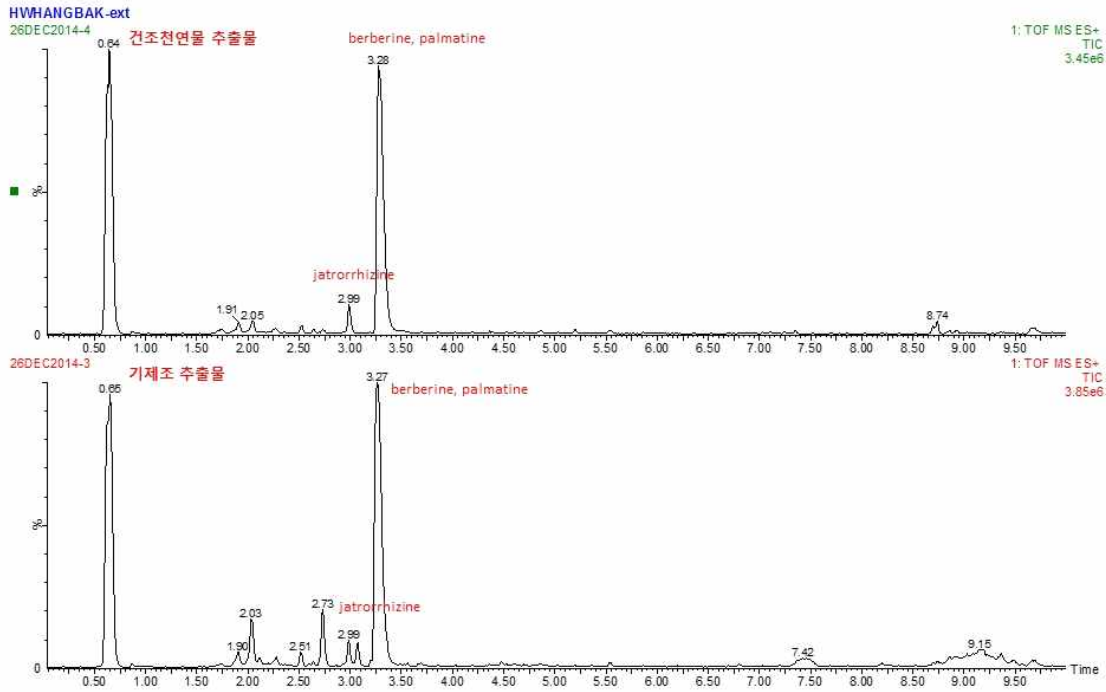
그림 3은 초음파 사진을 나타낸 것으로 정상번식우와 저수태우의 난소기능은 정상으로 확인이 된다. 정상적인 난소기능으로 우성난포 형성, 및 배란과 황체가 형성되는 모습이 모두 관찰 가능하였으며 자궁경관과 자궁각, 자궁의 구조적 기형에 따른 이상은 발견되지 않았다.

호르몬 분석과 생식도관 내 초음파촬영을 통하여 현재 실험에 이용되고 있는 저수태우는 정상적인 내분비와 생식기능을 가지고 있는 것으로 판단이 된다. 즉, 이러한 결과는 원인이 불분명한 저수태우를 자궁 내 미생물 환경에서 유추하는 연구의 필요성과 당위성을 설명해 줄 수 있는 부분이라고 생각된다.

4. 천연추출물의 유효성분 분석

황백 MS 프로파일

+ve mode



환삼덩굴 MS 프로파일

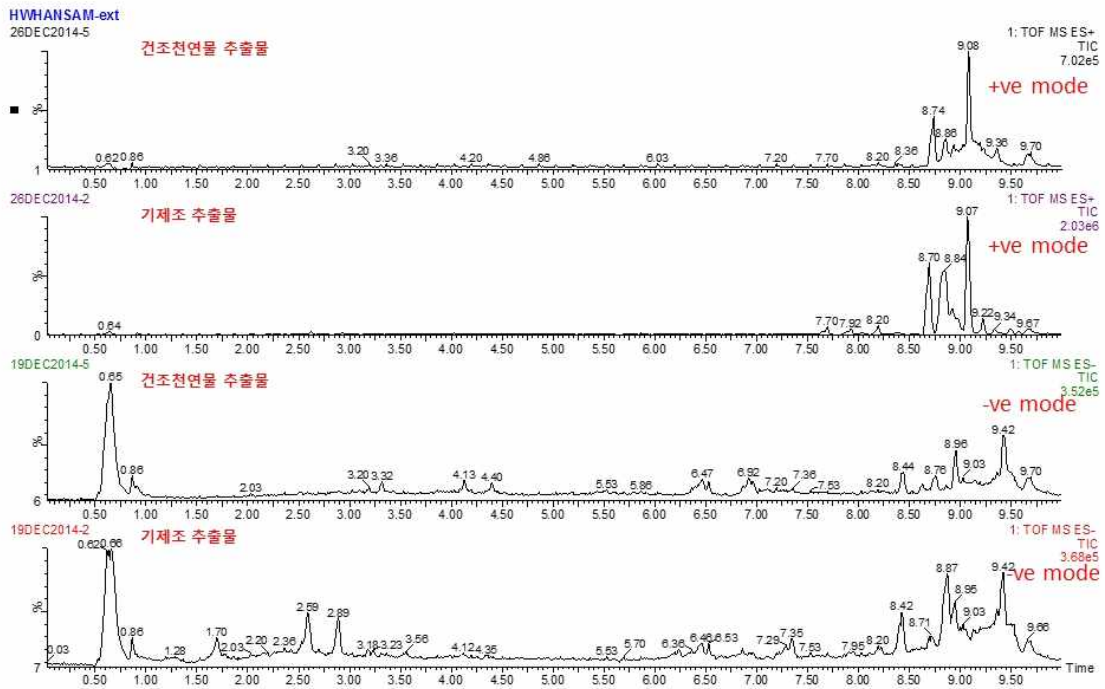


그림 4. 황백 및 환삼덩굴의 유효성분 분석을 위한 프로파일 결과

본 과제의 실험에 사용된 황백과 환삼덩굴 추출물의 유효성분을 조사하기 위하여 강원대학교 약학대학의 실험실에 성분 분석을 의뢰하였다. 분석에 사용된 샘플은 우리 연구팀이 직

접 추출한 황백과 환삼덩굴의 기제조 시료와 약재상에서 구입한 건조된 약재시료를 구입하여 각 2가지 시료를 비교 분석하였다. 분석 천연물들은 모두 100% 메탄올로 추출한 것을 사용하였다. 그림 4는 분석된 샘플의 프로파일링 결과를 나타낸 것이다 황백의 경우에는 이미 많은 분석연구와 성분에 대한 정보가 논문으로 알려져 있으며, 실제 분석결과에서도 이미 알려진 내용과 동일하게 알칼로이드 성분인 berberine, palmatine이 가장 많은 면적값을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 기제조 및 건조 천연물, 두 가지 시료의 프로파일에도 큰 차이가 없었지만 기제조 추출물의 경우에는 마이너한 성분들이 더 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 유효성분으로 확인되는 berberine과 palmatine의 경우에는 모두 구입이 가능한 물질이며, 각 성분에 대해 활성연구를 진행할 필요가 있다고 생각되나, 본 연구에서 진행되기에는 연구수행 기간 동안 불가능하다고 판단하였다. 환삼덩굴의 경우에는 다양한 조건에서 측정을 하여 비교를 하였지만 황백의 경우처럼 주성분으로 불릴만한 것을 구분하지 못하였다. 두 가지 시료 내 함유 성분 간에도 차이가 나타났다. 논문검색에서도 분석논문은 발견되지 않았으며, 성분연구 논문에서 flavonoid나 phloroglucinol 등의 성분들이 보고되었지만, 각 피크에 대해 ID를 확인하는 데에 어려움이 존재했다. 환삼덩굴의 성분과 항균활성에 대해서는 물질확보 과정이 추가적으로 필요하여 약 6~7개월의 시간이 필요하다는 의견을 분석 의뢰 실험실로부터 답변을 받았으나, 결과 도출 시까지의 남은 연구수행 기간의 부족과 추가 인력 및 비용 편성에 애로사항이 있어 추가적인 성분 분석은 이루어지지 않았다.

5. 37종의 자궁 및 정액으로부터 분리된 균과 생식세포에 미치는 영향

1협동 연구팀에서 분리 동정된 균을 전달받아 실험에 이용하였다. 균은 자궁 내 분리균 26종, 정액 내 분리균 11종을 이용하였으며(표 1) 상실배 단계의 수정란과의 공배양을 통해 균이 생식세포에 미치는 영향을 검토하였다.

표 1. 자궁 내 관류액 및 동결정액으로부터 분리된 균주 목록

No.	균주 명	구 분	비 고
1	<i>Streptococcus infantarius sspcoli</i>	자궁 관류액	
2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	자궁 관류액	저수태우
3	<i>Granulicatella elegans</i>	자궁 관류액	
4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	자궁 관류액	
5	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	자궁 관류액	저수태우
6	<i>Staphylococcus lentus</i>	자궁 관류액	
7	<i>Bacillus lentus</i>	자궁 관류액	
8	<i>Bacillus pumilus</i>	자궁 관류액	
9	<i>Pantoea spp</i>	자궁 관류액	
10	<i>Brucella melitensis</i>	자궁 관류액	
11	<i>Serratia plymuthica</i>	자궁 관류액	
12	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	자궁 관류액	
13	<i>Granulicatella adiacens</i>	자궁 관류액	
14	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	자궁 관류액	
15	<i>Staphylococcus xylosus</i>	자궁 관류액	
16	<i>Staphylococcus sciuri</i>	자궁 관류액	

17	<i>Kocuria rosea</i>	자궁 관류액	
18	<i>Enterobactor aerogenes</i>	자궁 관류액	저수태우
19	<i>Bacillus licheniformis</i>	자궁 관류액	
20	<i>Rothia mucilaginosa</i>	자궁 관류액	
21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	자궁 관류액	
22	<i>Alloiococcus otitis</i>	자궁 관류액	저수태우
23	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	자궁 관류액	저수태우
24	<i>Streptococcus alactolycus</i>	자궁 관류액	
25	<i>Pasteurella canis</i>	자궁 관류액	
26	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	자궁 관류액	
27	<i>Kocuria kristinae</i>	동결 정액	
28	<i>Streptococcus uberis</i>	동결 정액	
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	동결 정액	저수태우
30	<i>Streptococcus sanguinis</i>	동결 정액	
31	<i>Staphylococcus homonis ssp hominis</i>	동결 정액	
32	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	동결 정액	저수태우
33	<i>Serratia marcescens</i>	동결 정액	저수태우
34	<i>Escherichia coli</i>	동결 정액	저수태우
35	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	동결 정액	저수태우
36	<i>Oligella ureolytica</i>	동결 정액	저수태우
37	<i>Kocuria varians</i>	동결 정액	

위의 균주들은 TSA 배지에 접종된 상태로 전달받아 각 균주마다 colony가 형성되어 있는 상태로, 각 colony에서 멸균된 yellow tip을 이용하여 동일량의 균주를 채취하여 각 수정란의 발달 배양액에서 38.5°C, 5% CO2의 조건에서 24시간 동안 공배양을 시킨 후, 균주가 접종된 배양액을 상실배 단계의 수정란이 배양되고 있는 30ul drop에 5ul 분주하여 인큐베이터에서 38.5°C, 5% CO2, 5% O2의 조건에서 발달배양 후 생존율을 조사하였다.

표 2. 각 균주의 colony 특색과 수정란 발달배양액(pH 7.2)과의 공배양(24h) 후 배양액 pH의 변화

No.	균주 명	Colony 특색	배양액 pH
1	<i>Streptococcus infantarius sspcoli</i>	특이사항 없음	변화 없음
2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	특이사항 없음	변화 없음
3	<i>Granulicatella elegans</i>	특이사항 없음	변화 없음
4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	특이사항 없음	변화 없음
5	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	하얀색, 단단히 굳음	변화 없음
6	<i>Staphylococcus lentus</i>	특이사항 없음	변화 없음
7	<i>Bacillus lentus</i>	갈색	변화 없음
8	<i>Bacillus pumilus</i>	특이사항 없음	변화 없음
9	<i>Pantoea spp</i>	특이사항 없음	변화 없음
10	<i>Brucella melitensis</i>	특이사항 없음	변화 없음
11	<i>Serratia plymuthica</i>	질은 하얀색	변화 없음
12	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	노란색	변화 없음
13	<i>Granulicatella adiacens</i>	특이사항 없음	변화 없음

14	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	하얀색	6.6
15	<i>Staphylococcus xylosus</i>	하얀색	6.8
16	<i>Staphylococcus sciuri</i>	하얀색과 노란색이 뒤섞임	변화 없음
17	<i>Kocuria rosea</i>	유백색	변화 없음
18	<i>Enterobactor aerogenes</i>	하얀색	변화 없음
19	<i>Bacillus licheniformis</i>	특이사항 없음	변화 없음
20	<i>Rothia mucilaginosa</i>	열은 하얀색	변화 없음
21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	노란색과 갈색이 뒤섞임	변화 없음
22	<i>Alloiococcus otitis</i>	특이사항 없음	변화 없음
23	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	하얀색	6.4
24	<i>Streptococcus alactolyucus</i>	특이사항 없음	변화 없음
25	<i>Pasteurella canis</i>	노란색과 유백색	6.4
26	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	특이사항 없음	변화 없음
27	<i>Kocuria kristinae</i>	특이사항 없음	변화 없음
28	<i>Streptococcus uberis</i>	열은 하얀색	6.8
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	검은색	6.8
30	<i>Streptococcus sanguinis</i>	열은 하얀색	5.8
31	<i>Staphylococcus homonis ssp hominis</i>	하얀색	6.8
32	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	특이사항 없음	변화 없음
33	<i>Serratia marcescens</i>	하얀색과 노란색이 뒤섞임	변화 없음
34	<i>Escherichia coli</i>	특이사항 없음	6.0
35	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	노란색	변화 없음
36	<i>Oligella ureolytica</i>	특이사항 없음	변화 없음
37	<i>Kocuria varians</i>	특이사항 없음	변화 없음

표3 . 각 균주와 수정란과의 공배양 후 생존율 조사

No.	균주 명	생존기간(일)	부화율(%)	비 고
1	<i>Streptococcus infantarius sspcoli</i>	3	0	
2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3	0	
3	<i>Granulicatella elegans</i>	7	50	
4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3	0	
5	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	7.5	50	
6	<i>Staphylococcus lentus</i>	3.5	20	
7	<i>Bacillus lentus</i>	4	0	
8	<i>Bacillus pumilus</i>	5.5	50	배양액 뿌영게 변함
9	<i>Pantoea spp</i>	6	33.3	배양액 뿌영게 변함
10	<i>Brucella melitensis</i>	4.5	0	배양액 뿌영게 변함
11	<i>Serratia plymuthica</i>	4	0	
12	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	4	0	배양액 뿌영게 변함
13	<i>Granulicatella adiacens</i>	3.5	0	
14	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	7	33.3	
15	<i>Staphylococcus xylosus</i>	3.5	0	배양액 뿌영게 변함
16	<i>Staphylococcus sciuri</i>	7	50	배양액 뿌영게 변함

17	<i>Kocuria rosea</i>	6	50	
18	<i>Enterobactor aerogenes</i>	5.5	33.3	
19	<i>Bacillus licheniformis</i>	3.5	0	
20	<i>Rothia mucilaginosa</i>	3	0	
21	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.5	33.3	
22	<i>Alloiococcus otitis</i>	4.5	55.6	
23	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	6	75	
24	<i>Streptococcus alactolyucus</i>	3.5	70	
25	<i>Pasteurella canis</i>	3	33.3	
26	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5	66.7	
27	<i>Kocuria kristinae</i>	5.5	0	
28	<i>Streptococcus uberis</i>	7	60	
29	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	60	배양액 뿌옇게 변함
30	<i>Streptococcus sanguinis</i>	4	0	
31	<i>Staphylococcus homonis ssp hominis</i>	4	0	
32	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	2	0	배양액 뿌옇게 변함
33	<i>Serratia marcescens</i>	3.5	0	배양액 뿌옇게 변함
34	<i>Escherichia coli</i>	6.5	57.1	
35	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	1	0	
36	<i>Oligella ureolytica</i>	3.5	0	배양액 젤리화 됨
37	<i>Kocuria varians</i>	1	0	두꺼운 막 형성

37종의 균주를 이용하여 수정란과의 공배양을 통해 생존율을 조사하였다(표 3). 우선, 발달 배양액과의 24시간의 공배양을 통한 pH를 변화를 조사하였다(표 2). 리트머스 종이를 이용한 간이 pH 측정을 통하여 배양액의 pH를 조사하였다. 대부분의 처리군에서 pH의 변화는 감지되지 않았지만, 일부의 균주 처리군에서 약알칼리로의 pH 변화를 확인할 수 있었다. 한편, 각 균주와 공배양된 상실배 단계의 수정란의 생존율을 확인한 결과, 균주에 따라 생존 일수에 있어서 편차가 다양하게 관찰되었으며, 1~7일 사이의 생존일을 보여주었다. 그러나 전체적으로 공배양 1~3일 이내에 발달속도나 세포질의 질적 수준이 현저히 떨어짐을 육안으로 쉽게 확인이 가능하였다. 부화율 또한 대부분의 공배양 처리군에서 부화배반포로 발달하지 않거나 부화율이 낮게 나타남을 알 수 있었으며, 부화되는 시기 또한 정상적인 부화시기보다 1~3일 단축되어 나타나는 경우도 관찰할 수 있었다. 실험결과 도출에 있어서, 균주의 처리군 수가 많고 전문적으로 균을 다룰 수 있는 인큐베이터 및 실험장비의 별도 운영이나 실험공간의 격리구분에 한계가 존재하여 3회 이상의 반복수를 수행하지 못한 점이 있으나, 자궁 및 동결정액에서 분리·동정된 균주들은 수정란의 발달에 유해한 영향을 미치는 점에 대해서는 확인할 수 있었다. 그러므로 암소 자궁 내에 존재할 수 있는 위와 같은 균주들의 제거가 적절히 이루어진다면, 수정란 이식이나 인공수정 시의 수태율 개선에 도움이 될 것이라 생각된다.

6. 천연 추출물의 자궁 내 주입방법 고안

황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입을 위하여 우선적으로 희석방법과 대용량을 손쉽게 제조할 수 있는 방법을 고안하고자 하였다. 천연물의 안전성 검증을 위한 *In vitro*의 항균 실험에서는 소량의 마이크로 단위로 희석배율이 이루어졌는데(0.1, 0.05, 0.01 ug/ml), 이

를 현장(*in vivo, field trial*)에서 사용한 결과 자궁 내 균총의 변화가 발견되지 않았다. 그러므로 한우 암소의 자궁 내 주입 시에는 *in vitro*보다 천연물의 농도를 높여 실험을 수행하였다. 1:100 처리균(10 mg/ml), 1:1000 처리균(1 mg/ml), 1:10000 처리균(0.1mg/ml)을 이용하였다. 한편, 일반적으로 추출방법에 따라 추출물을 희석하는 데에 멸균증류수나 DMSO를 이용하여 용해하였는데 본 연구에서는 100 ml 이상 단위의 대용량 제조 시에는 추출물의 용해율이 떨어져 손실되는 부분이 다량 발생하였다. 그러므로 DMSO의 대안으로써 Medium Chain Triglycerides(MCT) oil(Now Foods, USA) 을 사용하였다(그림 5). 일반적으로 MCT oil은 코코넛유, 팜유에서 발견되는 천연의 지방산으로 이루어져 있으며, 체내 주입 시, 소화흡수가 빠르게 일어나는 특징이 있다. MCT oil은 hexane, DMSO와 함께 천연 추출물의 용해에 사용되는 대표적인 물질로 그동안 천연물질 연구에서 용해제로써 많이 사용되어져 왔다.

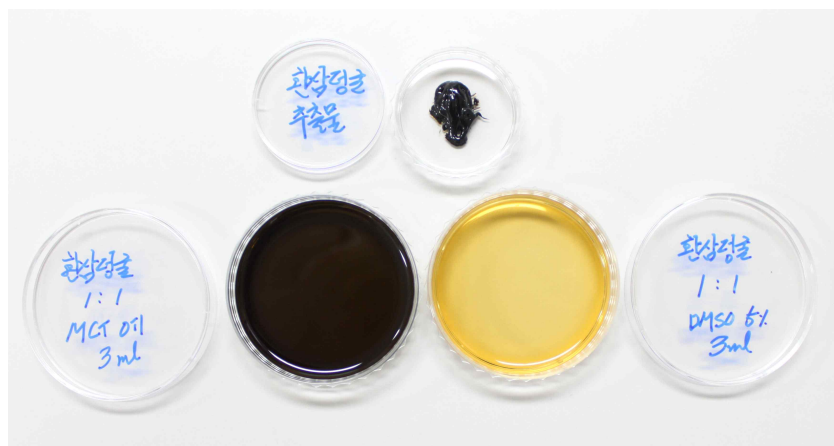


그림 5. 환삼덩굴 추출물의 용해제로써 MCO oil과 DMSO 5%의 비교



그림 6. 천연 추출물의 자궁 내 주입을 위한 장비

황백과 환삼덩굴 추출물 희석액의 자궁 내 주입을 위하여 실험기간 동안 주사약병 형태로 50 ml의 용량으로 밀봉하여 실험 시까지 보관하였다. 자궁 내로의 추출물 주입은 20 ml의 주사기와 스테인리스 재질의 약물 주입기를 사용하여 수행하였다(그림 6). MCT oil의 특성상 점도가 있어 일반적인 일회용 주사기로는 주입에 불편한 점이 있어 보다 적은 힘으로 손쉽게 주입을 하고 대용량의 주입도 가능하게끔 방법을 개선하였다.



그림 7. 천연 추출물의 대용량 주입기(A)와 10 ml의 소량 주입기(B)

100 ml 이상의 대용량 주입을 위하여 손쉽게 주입이 가능하도록 주름관 형태의 물통을 약물주입관과 스크류 형태로 결합하여 추출물의 주입 도중 분리되지 않도록 하였으며, 소량의 추출물 주입 시에는 주사기 관이 굵고 넓은 형태로 변경하여 보다 손쉽게 주입이 가능하도록 개선하였다(그림 7). 추후 제품의 상품화 시, 위의 2가지 형태로써 제작하여 개발할 계획이다.

7. 천연 추출물의 자궁 내 주입에 의한 개선효과(후산정체)

황백 추출물의 암소 자궁 내 주입 실험을 진행하는 동안 후산정체우가 발견되어 자궁액의 상태를 관찰할 수 있었다. 황백 추출물의 1:100 처리군의 실험대상우 중 1두였으며, 주입 당일(주입 전)을 0일로 하여 3일 간격으로 총 9일간의 자궁액을 채취하여 상태변화를 관찰하였다. 당시의 후산정체우는 58개월된 3산차의 암소로 분만 후 29일이 지난 상태였다. 발견 당일 채취된 자궁액의 상태는 분만 후 배출되지 못한 자궁 내 부산물들이 썩어가고 있는 단계로 악취와 높은 점성을 띄고 있었다. 약 300ml를 채취하여 제거시킨 후 황백 추출물(1:100) 10 ml를 자궁 내로 주입하였다. 추출물 주입 3일 후 채취된 자궁액은 정상적인 형태를 나타내었으며, 6일 및 9일 후의 자궁액 상태 또한 정상적인 것으로 관찰되었다(그림 8). 이러한 결과를 통하여 황백 추출물(1:100)이 분만 후 자궁회복을 촉진시키거나 후산정체와 같은 분만 후 후유증을 예방하여 분만 후 첫발정의 시기를 앞당기고 공태기간을 단축시켜 번식효율 향상에 도움이 될 것이라고 생각된다.

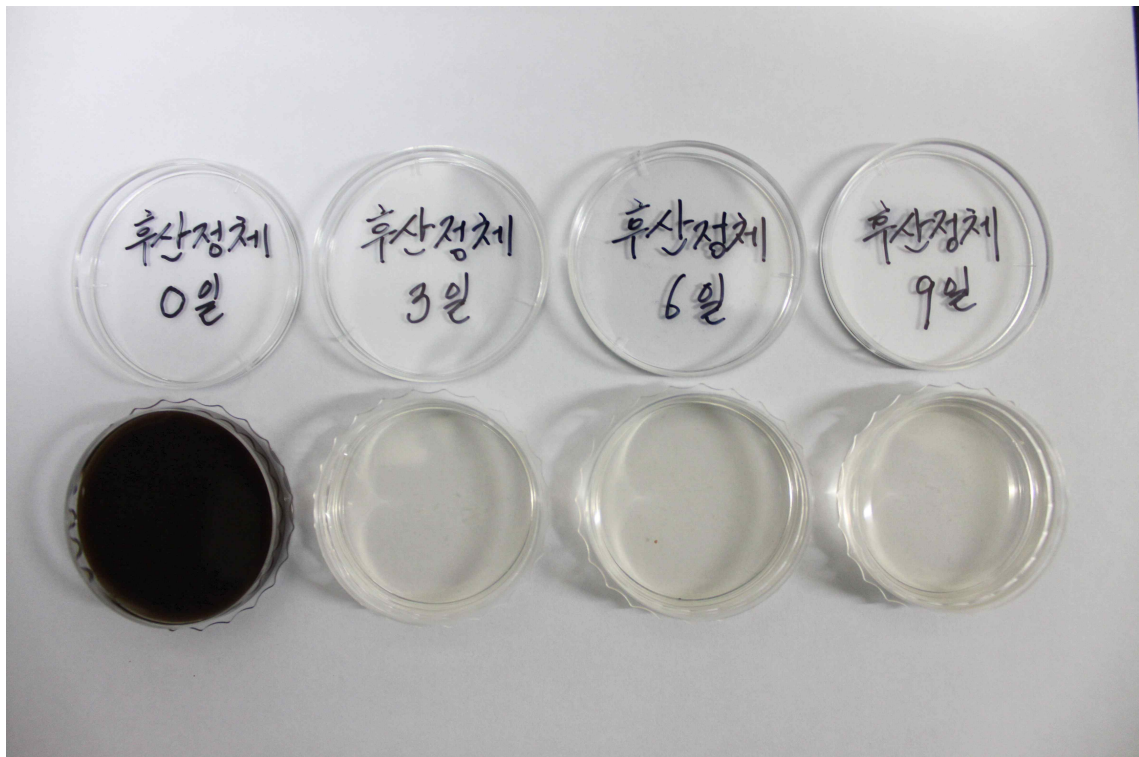


그림 8. 황백 1:100 처리군에 의한 한우 암소 후산정체우의 자궁 내 환경 개선

8. 천연 추출물의 자궁 내 주입 후 자궁 내 균 분석용 샘플 채취

실험에 이용된 황백과 환삼덩굴 추출물을 용매제와 1:10(g/ml) 으로 용해시킨 100% 원액을 각 100, 1000, 10000배로 희석하여 자궁 내 주입 실험을 실시하였다(그림 9). 각 희석배율로

희석시킨 추출물을 1차적으로 체외수정란과 공배양 실험한 결과, 1:100 및 1:1,000 처리군에서 체외수정율과 발달율이 저해되는 경향을 나타낸 반면, 1:10,000 처리군은 수정란의 발달율에 영향을 미치지 않았다.

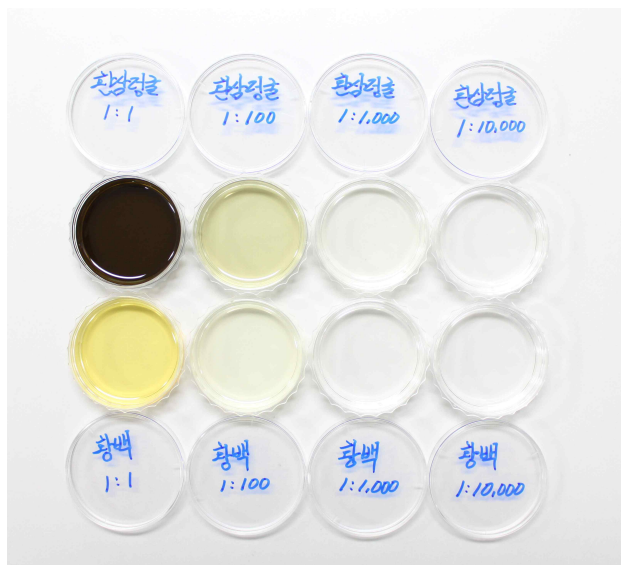


그림 9. 천연추출물의 자궁 내 주입 실험에 사용된 희석배율

한우 암소 자궁 내로의 주입은 위에 설명된 자궁 내 주입 장비를 이용하여 수행하였으며, 20 ml의 용량으로 1회 주입하였다. 추출물 주입 당일을 0일로 하여 시작일부터 3일 간격으로 4회, 총 9일의 기간동안 샘플 채취가 이루어졌으며 채취된 샘플은 각 냉장보관 후 1협동기관으로 전달되어 분석에 이용되었다. 자궁 내 균 샘플의 채취는 멸균증류수 30~60 ml를 사용하여 각 일차별로 자궁 내 주입 및 관류 후에 회수하여 이루어졌다. 대조군은 0일차의 샘플을 추출물 주입 전 채취하여 사용하였다.

9. 천연 추출물의 자궁 내 주입에 따른 인공수정 후 수태율 변화

황성 관내에 위치한 5농가(A~E)를 선정하여 황백과 환삼덩굴 추출물을 각 1:100, 1:1000, 1:10000의 비율로 희석시킨 희석액을 인공수정에 사용하여 수태율의 변화를 조사하였다. 각 농가의 협조를 통해 A농가 171두, B농가 120두, C농가 34두, D농가 75두, E농가 206두의 13~70개월령의 번식우를 실험축으로 사용하였다. 처리군과의 비교분석을 위한 대조군은 실험에 참여한 각 농가의 2014년 수정현황 및 결과자료를 이용하였다. 인공수정은 2014년 10월부터 2015년 11월까지(14개월) 수행하였다. 이용할 수 있는 암소에 PG 5 ml를 주사하여 배란동기화를 실시한 후, 발정이 발현된 개체들을 대상으로 실험을 수행하였다. PG 주사 후 발정 발현일을 발정주기의 시작으로 판단하고 재발예정일 2일전에 각 추출물 처리군 15 ml를 자궁 내로 주입하고 발정 후 수정적기에 인공수정을 실시하였다. 수태율의 조사는 인공수정 후 50일경에 자궁 내 초음파측정을 통하여 임신여부를 판단하였으며 4회 이상 인공수정을 실시하여 회수별에 따른 수태율을 조사하였다.

황백 및 환삼덩굴 추출물의 주입에 따른 인공수정 후 수태율 분석 결과, 황백 1:100 처리군이 수태율에 있어서 가장 좋은 개선율을 보여주었다(표 4, 5, 그림 10). 각 농가별 2014년도

의 인공수정 수태율 성적과 비교하였을 때에 3회 이상 수정 회수가 눈에 띄게 감소하였음을 알 수 있었다. 황백 1:1000 및 황백 1:10000 처리군 또한 수태율이 개선되는 결과를 얻을 수 있었다. 황백과 비교하여 환삼덩굴은 수태율 증진 폭이 적게 나타났으나 3회 이상 수정 개체수는 감소한 결과를 동일하게 얻을 수 있었다.

한편, 인공수정 수행 기간인 지난 14년 12월에 발생한 구제역의 여파로 일부 처리군에서 결과를 도출하지 못하였다. 15년 4월 이후로 구제역은 발병되지 않았으나 15년 6월까지 국가 감시체계의 주의단계 발령, 축산종사자 이동제한 및 농가 방역점검에 따른 출입차단으로 현장농가 실험에 많은 애로사항이 발생하였으며 계획대비 시간이 지연된 점이 있었다.

표 4. 황백 추출물의 자궁 내 주입에 의한 인공수정 후 수태율

구 분	Control		황백 1:100		황백 1:1,000		황백 1:10,000		
	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	
A 농 가	1회 중부 수태	58	51.8	40	71.4	36	72.0	19	70.4
	2회 중부 수태	33	81.3	14	96.4	11	94.0	5	88.9
	3회 중부 수태	19	98.2	2	100	2	98.0	3	100
	4회 이상 시도	2	-	0	-	1	-	0	-
	합계	112	-	56	-	50	-	27	-
B 농 가	1회 중부 수태	58	68.2	23	76.7	22	68.8	11	55.0
	2회 중부 수태	15	85.9	6	96.7	8	93.8	6	85.0
	3회 중부 수태	9	96.5	1	100	2	100	2	95.0
	4회 이상 시도	3	-	0	-	0	-	1	-
	합계	85	-	30	-	32	-	20	-
C 농 가	1회 중부 수태	25	73.5	15	88.2	6	85.7	-	-
	2회 중부 수태	7	94.1	2	100	0	85.7	-	-
	3회 중부 수태	2	100	0	-	1	100	-	-
	4회 이상 시도	0	-	0	-	0	-	-	-
	합계	34	-	17	-	7	-	-	-
D 농 가	1회 중부 수태	30	50.8	15	65.2	11	57.9	7	63.6
	2회 중부 수태	18	81.4	7	95.7	7	94.7	3	90.9

	3회 종부 수태	8	94.9	1	100	1	100	1	100
	4회 이상 시도	3	-	0	-	0	-	0	-
	합계	59	-	23	-	19	-	11	-
E 농 가	1회 종부 수태	77	50.0	28	75.7	27	62.8	33	68.8
	2회 종부 수태	50	82.5	7	94.6	12	90.7	11	91.7
	3회 종부 수태	22	96.8	2	100	4	100	4	100
	4회 이상 시도	5	-	0	-	0	-	0	-
	합계	154	-	37	-	43	-	48	-

표 5. 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입에 의한 인공수정 후 수태율

구 분	Control		환삼덩굴 1:100		환삼덩굴 1:1,000		환삼덩굴 1:10,000		
	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	암소 (두)	누적 수태율 (%)	
A 농 가	1회 종부 수태	58	51.8	-	-	9	56.3	10	45.5
	2회 종부 수태	33	81.3	-	-	4	81.3	7	77.3
	3회 종부 수태	19	98.2	-	-	2	93.8	4	95.5
	4회 이상 시도	2	-	-	-	1	-	1	-
	합계	112	-	-	-	16	-	22	-
B 농 가	1회 종부 수태	58	68.2	-	-	16	72.7	10	62.5
	2회 종부 수태	15	85.9	-	-	3	86.4	4	87.5
	3회 종부 수태	9	96.5	-	-	2	95.5	2	100
	4회 이상 시도	3	-	-	-	1	-	0	-
	합계	85	-	-	-	22	-	16	-
C 농 가	1회 종부 수태	25	73.5	8	80	-	-	-	-
	2회 종부 수태	7	94.1	2	100	-	-	-	-
	3회 종부 수태	2	100	0	-	-	-	-	-
	4회 이상 시도	0	-	0	-	-	-	-	-

— 시도									
합계		34	-	10	-	-	-	-	-
D 농 가	1회 중부 수태	30	50.8	7	50.0	4	50.0	-	-
	2회 중부 수태	18	81.4	5	85.7	2	75.0	-	-
	3회 중부 수태	8	94.9	2	100	1	87.5	-	-
	4회 이상 시도	3	-	0	-	1	-	-	-
합계		59	-	14	-	8	-	-	-
E 농 가	1회 중부 수태	77	50.0	16	50.0	10	55.6	13	46.4
	2회 중부 수태	50	82.5	11	84.4	6	88.9	8	75.0
	3회 중부 수태	22	96.8	4	96.9	2	100	5	92.9
	4회 이상 시도	5	-	1	-	0	-	2	-
합계		154	-	32	-	18	-	28	-

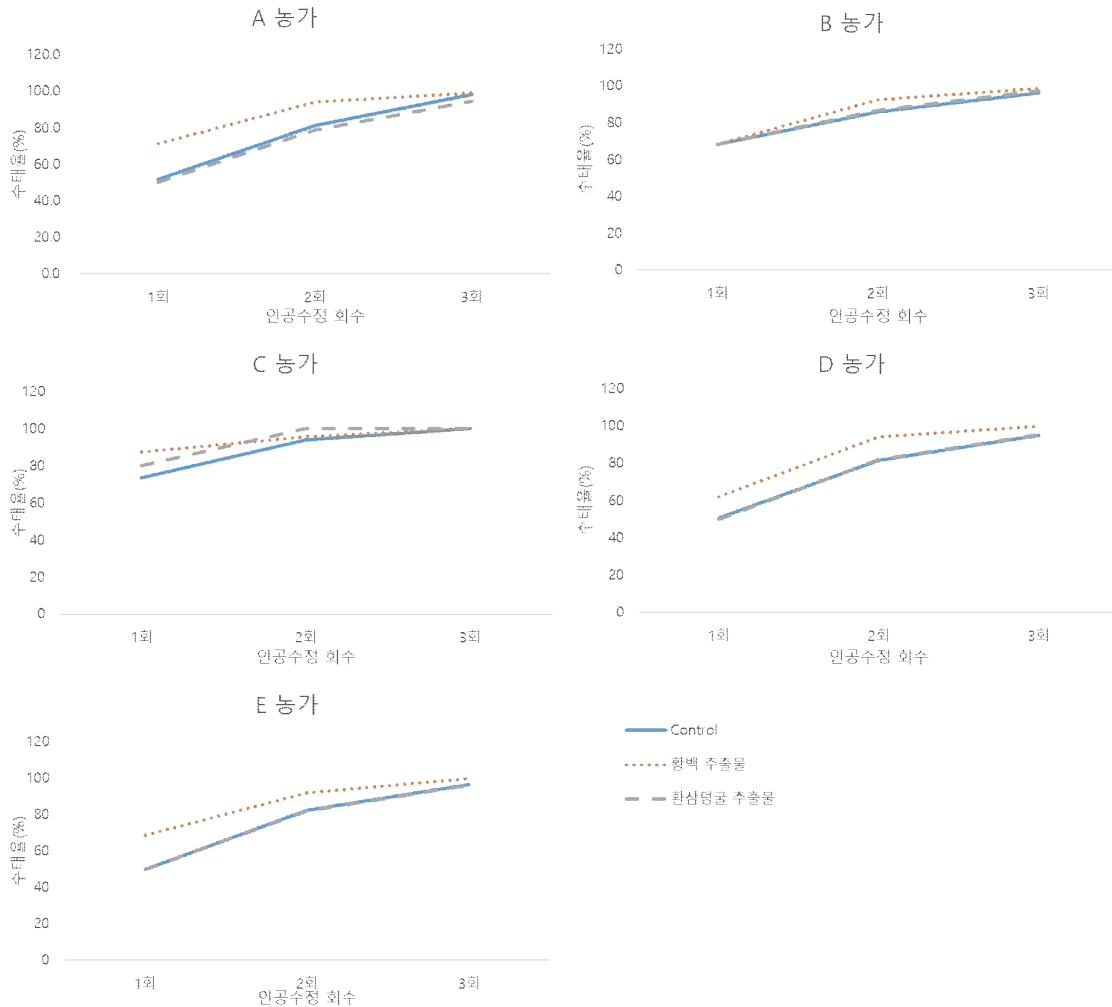


그림 10. 황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입에 따른 인공수정 후 수태율 변화

표 6. 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입에 의한 인공수정 후 수태율

	Control	황백			환삼덩굴		
		1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
1회중부 수태율	58.9±5.0 ^{bc}	75.4±3.8 ^a	69.4±4.7 ^{ab}	64.5±3.5 ^{ab}	60.0±10 ^b	58.7±4.9 ^{bc}	51.5±5.5 ^c
2회중부 수태율	85.0±2.4 ^c	97.5±1.1 ^a	91.8±1.7 ^b	89.1±1.5 ^b	90.0±5.0 ^b	82.9±3.1 ^d	79.9±3.8 ^d
3회중부 수태율	97.3±0.9 ^{ab}	100.0±0 ^a	99.6±0.4 ^a	98.8±1.3 ^a	99.0±1.0 ^a	91.4±1.9 ^c	96.1±2.1 ^b

표 6은 표 4와 5의 결과를 종합하여 황백 및 환삼덩굴 처리군별 수태율을 나타낸 것으로써, 황백 1:100 처리군이 1회 중부 수태율 결과에서 유의적으로 높게 나타났을 뿐만 아니라, 2회 및 3회 중부 수태율 결과에서도 유의적으로 높은 값을 나타냄을 알 수 있다. 황백 추출물의 1:1000, 1:10000 처리군 또한 대조군과 비교하여 개선된 수태율 결과를 보여주었으며, 이는 환삼덩굴 1:100 처리군과 유사한 결과임을 표 6을 통해 확인할 수 있다. 반면, 환삼덩굴 1:1000 및 1:10000 처리군은 대조군과 비교하여 수태율이 개선되지 못하였음을 확인할

수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 환삼덩굴 보다는 황백이 수태율 개선에 효과가 좋은 것으로 확인되며, 1:100 처리군이 1:1000, 1:10000 처리군보다 수태율 개선에 도움이 될 것이라고 생각된다.

10. 천연 추출물의 자궁 내 주입에 따른 수정란이식 후 수태율 변화

황성 2농가, 홍천 1농가를 대상으로 수정란 이식 후 수태율 변화를 조사하였다. 자연발정 개체를 대상으로 실험을 진행하였으며, 발정발견 후 5일째에 황백 1:100 및 환삼덩굴 1:100 추출물을 암소 자궁 내로 15 ml 주입하였으며 발정발견 후 7일째에 수정란 이식을 실시하였다. 수정란 이식에 사용된 수정란은 모두 체외·신선수정란을 사용하였으며, 배양 7~8일차 시기의 수정란을 이식하였다. 수태율은 2014년에 각 농가에서 실시되었던 수정란 이식 수태율을 대조군으로써 사용하여 비교·분석 하였다. 수태율 분석결과 인공수정 후 수태율과 마찬가지로 황백 1:100 처리군에서 수태율이 증가되는 것으로 조사되었다(표 7). 국내 평균 이식 수태율이 30~50% 임을 감안하였을 때에 본 실험에 사용된 황백 1:100의 추출물이 농가의 수태율 개선에 크게 도움이 될 것이라고 기대한다. 그러나, 수정란 이식은 수태율에 영향을 미치는 인자가 다양하게 존재하기 때문에 좀 더 명확한 수태율 개선 근거를 얻기 위해서는 많은 두수를 대상으로 다양한 지역에서 수정란 이식이 이루어져야 할 것이라고 생각된다.

표 7. 황백 1:100 및 환삼덩굴 1:100 추출물의 자궁 내 주입에 의한 수정란 이식 후 수태율

이식 처리군	A 농가		B 농가		C 농가	
	1회 이식	2회 이식	1회 이식	2회 이식	1회 이식	2회 이식
¹⁾ Control	15.2±3 ^b	27.3±4 ^b	31.3±1 ^b	37.5±3 ^b	34.3±5 ^b	54.3±7 ^b
황백 1:100	27.3±7 ^a	36.4±2 ^a	20.0±2 ^c	60.0±3 ^a	61.5±7 ^a	73.1±2 ^a
환삼덩굴 1:100	22.2±4 ^a	33.3±3 ^a	44.4±1 ^a	44.4±7 ^b	40.7±4 ^b	55.6±8 ^b

¹⁾Control: 2014년도 농가 이식 수태율

11. 천연 추출물의 자궁 내 주입에 따른 번식효율 개선

인공수정을 실시했던 5농가를 대상으로 기초적인 발정재귀일, 중부회수, 공태기간의 번식지표를 조사하였다. 황백 및 환삼덩굴 추출물을 사용하였을 때에 모든 번식지표에서 번식효율이 개선된 점을 확인할 수 있었다. 우선적으로 인공수정 회수가 감소한 것을 확인할 수 있었는데, 이는 수태율 증가와 연결되는 것으로써 농가의 번식률 개선에 크게 도움이 되는 점이라고 판단된다. 환삼덩굴보다는 황백이 특히 좋은 결과를 얻을 수 있었다(표 8). 평균 중부회수 외에 조사된 평균 발정재귀일, 평균 공태기간의 경우에는 단순히 본 실험에 사용된 천연추출물에 의한 것이라고 판단하기는 어렵다. 우선적으로 농가의 사양관리 방법이 크게 영향을 미치는 사항이며, 본 실험 수행 기간 동안 각 농가주인이 실험대상우의 사양과 임신 감정 등의 관리에 시간을 많이 할애한 점이 있었기에 이 부분의 영향이 크게 작용하였을 것이라고 생각된다.

표 8. 한우 번식농가의 평균 발정재귀일, 평균 종부회수, 평균 공태기간에 대한 기초자료

농가 구분		평균 발정재귀일	평균 종부회수	평균 공태기간
A 농가	¹⁾ Control	71.4	1.69	103.8
	황백 추출물	67.5	1.35	77.9
	환삼덩굴 추출물	67.8	1.76	83.7
B 농가	Control	83.1	1.49	108.3
	황백 추출물	70.4	1.40	83.5
	환삼덩굴 추출물	71.2	1.47	81.2
C 농가	Control	93.6	1.32	125.7
	황백 추출물	85.5	1.17	103.1
	환삼덩굴 추출물	92.3	1.20	105.9
D 농가	Control	98.1	1.73	113.8
	황백 추출물	65.3	1.43	79.5
	환삼덩굴 추출물	76.4	1.73	90.8
E 농가	Control	100.3	1.71	143.8
	황백 추출물	91.7	1.39	108.9
	환삼덩굴 추출물	82.6	1.72	105.3

1)Control: 2014년도 농가 현황

제 2 절 1협동과제 연구수행 내용 및 결과

1. 한우 자궁 내 미생물의 분류 및 동정

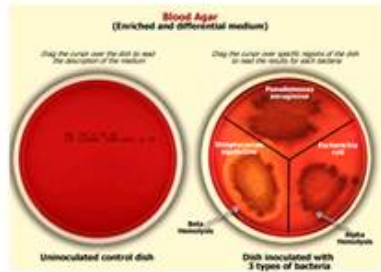
(1) 실험방법

① 한우 자궁 세척액 및 정액 내 세균의 분리 및 동정

소 자궁 및 정액 내 세균을 배양하기 위해 한우 자궁 세척액과 동결정액을 멸균된 micro centrifuge tube에 분주하였으며, 음성대조군으로는 멸균된 증류수를 분주하였다. 각각의 시료에 PBS를 1:1로 첨가하여 희석한 뒤, MacConkey Agar(Difco, USA)와 Blood Agar(Difco)에 100 ul씩 도말하였다. 5% CO₂ 일반 호기성 조건과 혐기성 조건(GasPak™ Systems; BBL, USA)으로 37℃에서 48~72시간 배양한 후 관찰된 집락을 모양과 색깔별로 분류하였다. 분류한 colony를 새로운 혈액배지에 각각 접종하여 동일한 조건으로 배양한 뒤 Gram 염색을 통해 그람양성균과 그람음성균으로 나누었으며, VITEK 2 system(bioMerieux Inc, Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 균을 분리 및 동정하였다.

② 항균성 물질의 추출

항균성 시험 천연물질로 한약재 또는 야생초인 황백, 환삼덩굴, 제비꽃, 홍화 그리고 백굴채를 사용하였으며, 강원도 평창군 진부면에 위치한 비엔허브에서 건조된 상태인 것을 구입



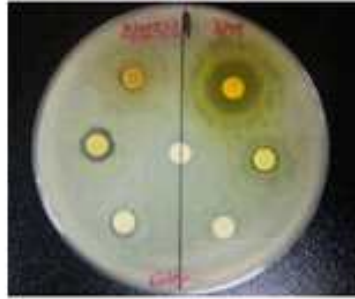
하였다. 불순물을 제거하기 위해 2번 세척 후 건조하여 추출용 시료로 사용하였다. 건조한 각각의 시료를 300g씩 flask에 넣고 MeOH 3L를 넣은 후 수욕상에서 4시간씩 2회 환류추출하고 탈지면으로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액은 회전진공농축기(Rotary Vacuum Evaporator; EYELA N-N type, Tokyo Rikakikai, Japan)를 사용하여 40℃에서 농축하여 환삼덩굴의 MeOH 추출물 51g과 황백의 MeOH 추출물 70g 등 각각의 추출물을 얻었다(Table 1). 추출물은 DMSO 10%에서 0.1%까지의 추출물을 녹이기 위한 대조군용 수용액을 만들어 1g/ml 농도에서 0.01g/ml 농도까지 제작하여 본 실험에 이용하였다.

Table 1. Yield of organic extracts from natural substance

No.	Extracts	Dried weight (g)	Yield (%)
1	<i>Humulus japonicus</i> (환삼덩굴)	51	17.0
2	<i>Phelledendron amurense</i> (황백)	70	23.3
3	<i>Viola mandshurica</i> (제비꽃)	44	14.7
4	<i>Carthamus tinctorius</i> (홍화)	79	39.5
5	<i>Chelidoni Herba</i> (백굴채)	32	12.8

③ 천연물질의 항균효과 시험

소 자궁 및 정액 내에서 분리된 세균을 대상으로 천연물질의 항균성을 조사하기 위해 TSA 배지에서 자란 colony를 PBS 3ml에 접종하여 MacFaland turbidity standard 0.5의 농도가 되도록 배양하였다. TSA배지에 배양액 100ul를 떨어뜨린 다음 멸균된cotton swab을 이용하여 고르게 잘 펴서 바른 다음 완전히 건조될 때까지 실온에서 2~3분 정도 방치하였다. 6mm 지름을 가진 원형의 blank paper disc(BD)를 시료의 수에 맞게 올리고 밀착시킨 다음 천연물질 추출물 시료 10 ul, 대조군은 2.5% DMSO 10 ul를 떨어뜨려 천천히 흡수시켰다. 실온에서 1시간동안 흡착시킨 다음 37℃, 5% CO2 incubator에서 24시간 배양한 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 직경을 mm단위로 측정하여 항균 활성 정도를 판정하였다.



(2) 한우 자궁 내 세균 분석 결과

① 미경산 한우의 자궁 내 세균 분석

미경산 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 6개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 모든 개체에서 1개 이상의 균이 검출되었다(Table 2). 검출된 균은 10종으로 그 중 *B. pumilus*는 5개체에서 발견되어 83.3%의 매우 높은 수준의 검출율을 나타냈으며, *S. lentus*와 *S. vitulinus*는 각각 2개체에서 발견되어 33.3%의 검출율을 보였다.

② 정상번식 한우의 자궁 내 세균 분석

정상번식 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 13개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 7개체에서 균이 검출되었으며, 1개체에서는 균이 검출되지 않았고, 5개체에서는 균이 분리되었지만 VITEK II system(bioMérieux Inc)으로 동정되지 않았다(Table 2). 검출된 균은 9종이며, 그 중 *S. lentus*는 4개체에서 발견되어 30.7%의 검출율을 나타냈으며, *E. casseliflavus*는 2개체에서 발견되어 15.3%의 검출율을 보였다.

③ 번식장애 한우의 자궁 내 세균 분석

번식장애 한우의 자궁 내 세균총을 조사하기 위해 8개체의 자궁 세척액에서 분리된 균을 분석한 결과 1개체를 제외한 나머지 7개체에서 1개 이상의 균이 검출되었다(Table 2). 검출된 균은 12종이며, *G. adiacens*는 4개체에서 발견되어 50%의 높은 수준의 검출율을 나타냈으며, *S. alactolyticus*와 *K. rosea*는 3개체에서 발견되어 37.5%, *S. paucimobilis*는 2개체에서 발견되어 25%의 검출율을 보였다.

④ 한우 정액 내 세균 분석

한우 정액 내 세균의 분포를 조사하기 위해 15개의 인공수정용 정액에서 분리된 균을 분석한 결과 9개의 시료에서 균이 검출되었으며, 3개의 시료에서는 균이 검출되지 않았고, 나머지 3개의 시료에서는 균이 분리되었지만 VITEK II system(bioMérieux Inc)으로 동정되지 않았다(Table 2). 검출된 균은 13종으로 그 중 *S. paucimobilis*와 *S. uberis*는 3개의 시료에서 관찰되어 20%의 검출율을 보였다.

Table 2. Identification of bacteria isolated from normal Hanwoo uterus flushing, repeat breeder cow (RBC) uterus flushing and Hanwoo semen

No.	Bacteria	미경산우	정상번식	저수태우	정액
1	<i>Staphylococcus lentus</i>	2	4		
2	<i>Bacillus pumilus</i>	5	1		

3	<i>Serratia plymuthica</i>	1			
4	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	2			
5	<i>Bacillus licheniformis</i>	1			
6	<i>Paenibacillus polymyxa</i>		1		
7	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	2		
8	<i>Kocuria rosea</i>	1		3	
9	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	1	2	2
10	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1			
11	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1			
12	<i>Granulicatella elegans</i>		1		
13	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>		1	1	
14	<i>Bacillus lentus</i>		2		
15	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>coli</i>		1		
16	<i>Pantoea</i> subsp.		1		
17	<i>Enterobacter aerogenes</i>			1	
18	<i>Rothia mucilaginosa</i>			1	
19	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			1	2
20	<i>Streptococcus alactolyticus</i>			3	
21	<i>Granulicatella adiacens</i>			4	
22	<i>Alloiococcus otitis</i>			1	
23	<i>Staphylococcus chromogenes</i>			1	
24	<i>Gardnerella vaginalis</i>			1	
25	<i>Pasteurella canis</i>			1	
26	<i>Kocuria kristinae</i>				2
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				1
28	<i>Streptococcus sanguinis</i>				1
29	<i>Streptococcus uberis</i>				3
30	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i>				1
31	<i>Escherichia coli</i>				1
32	<i>Oligella ureolytica</i>				1
33	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>				1
34	<i>Serratia marcescens</i>				1
35	<i>Bacillus sporothermodurans</i>				1
36	<i>Kocuria varians</i>				1

유익균, 잠재적 위해균, 심장염 또는 소 유방염

⑤ 미경산 한우와 정상번식 한우의 자궁세척액에서 분리한 균의 분석

일반적으로 토양이나 물과 같은 환경상태에 널리 분포되어 있는 균으로 대부분 건강한 동물이나 사람에게 심각한 질병을 일으키지는 않지만 면역력이 저하된 숙주에게는 기회감염을 통해 질병을 일으키기도 한다. 미경산 한우의 자궁에서 가장 높은 빈도로 분리된 *B. pumilus*는 식물의 성장에 있어 중요한 역할을 하는 토양균으로 보통 임상적으로는 병원성을 나타내지 않는다. 정상번식 한우에서 가장 많이 분리된 *S. lentus*는 가축의 피부나 점막 표면에 서식하는 균으로 한국의 발효음식인 된장에서 주로 발견되며 일반적으로 병원성을

가지고 있지 않다. 다음으로 높게 분리된 *E. casseliflavus*는 사람과 동물의 장내에서 주로 발견되며, 국내 야생 거위의 분변 시료에서 20% 이상 검출되었다고 보고된 바 있지만 일반적으로 비병원성 세균으로 알려져 있다.

⑥ 번식장애 한우의 자궁세척액에서 분리한 균의 유해성

번식장애 한우의 자궁 세척액에서 가장 많이 분리된 *G. adiacens*는 nutritionally variant streptococci(NVS)로 불리기도 하며, 사람에게 감염성 심장 내막염을 일으켜 높은 치사율을 나타낸다. 다음으로 많이 분리된 *K. rosea*는 비병원성 세균으로 인식되고 있지만 기회 감염을 통해 최근 하행 괴사성 중격동염의 발병 사례가 있으며, *S. alactolyticus*는 드물게 신생아에게 respiratory distress syndrome(RDS)를 일으키는 사례가 발생되고 있다. 또한 *A. otitis*는 중이염에 걸린 환자에서 높은 빈도로 검출되고 있으며, 특히 어린이에게서 발생하는 이염과 밀접한 연관이 있다는 연구가 보고되고 있으며, *S. paucimobilis*는 가축에 대한 병원성은 아직 알려진 것이 없고 면역력이 약화된 아이들에게 드물게 감염되기도 하지만 심각한 증상을 일으키지 않는다. 한편, *E. rhusiopathiae*는 동물에게 병원성을 일으키는 균주로 드물게 어린 암소에서 치사율이 높은 급성 심장 내막염을 일으키기도 한다. 또한 인공수정용 정액에서 가장 많이 발견된 *S. uberis*는 소에서 유방염을 일으키는 병원성 균주로 감염되면 심각한 균혈증 또는 패혈증을 동반한다고 보고된 바 있다.

⑦ 분리된 균의 저수태우 원인 가능성과 수태율의 영향

한우의 자궁 및 정액 내에는 무균상태이어야 함에도 불구하고 많은 개체에서 다양한 균이 검출되었다. 게다가 미경산 한우, 정상 한우 그리고 번식장애 한우의 자궁 세척액과 인공수정용 정액 내 세균의 분포는 서로 다른 양상을 나타냈다. 특히 번식장애 한우의 자궁 세척액에서 발견된 다수의 병원성 세균은 수태에 필요한 자궁 내 환경에 상당한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 예를 들어 생식기를 통해 *Escherichia coli*와 같은 병원성 세균에 감염되면 자궁의 방어기전에 관여하는 다형핵 호중구(Polymorphonuclear neutrophils, PMNs)가 자궁 내로 유입되어 면역 체계 반응을 개시하게 되며, 염증 반응이 발생하면 사이토카인의 분비로 인해 정상적인 임신 관련 호르몬의 합성을 방해하여 수태율을 떨어뜨리는 원인이 되기 때문에 자궁 내 미생물 환경을 조절하는 것이 중요하다.

결론적으로 한우의 자궁과 정액 내에서 분리 및 동정된 다수의 미생물들은 대부분 비병원성이었지만 일부 번식장애 한우와 정액에서는 치명적인 증상을 일으킬 수 있는 병원성 세균이 분리되었다.

2. 한우 자궁 내 분리 세균에 대한 천연물질의 항균효과

(1) 실험방법

① 한우 자궁내 분리세균에 대한 천연물질의 항균효과

다양한 약용식물 추출물과 여러 종의 균에 대한 항균효과를 알아보기 위해 1차, 2차로 나누어 실험을 진행하였다. 1차 실험에서는 자궁 세척액에서 검출된 20종의 균을 대표하여, 가장 높은 빈도로 검출된 *S. lentus*, *S. infantarius* subsp. *coli*, *B. pumilus*에 대한 5 가지 약용식물 추출물의 항균효과를 보았으며, DMSO의 농도 차이가 항균효과에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 10%, 5%, 1% 및 0.1%의 DMSO의 농도

로 실험하였다. 그 결과 희석액으로 사용한 각각 다른 농도의 DMSO는 천연물질의 항균 효과에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 2차 실험에서는 자궁 세척액에서 추출한 총 20종의 균에 대한 천연물질의 항균효과를 알아보기 위해 2.5 %의 DMSO농도만을 사용하였다. 또한 1차 실험에서 5가지 약용식물 추출물에 대해 항균효과를 조사한 결과 가장 효과가 좋았던 황백과 환삼덩굴 추출물에 대해서만 2차 실험을 진행하였다.

(2). 한우 자궁 내 분리 세균에 대한 천연물질의 항균효과 결과

① 황백의 항균효과

황백은 추출물을 분리할 때의 수율이 23.3 %로, 홍화(39.5 %) 다음으로 우수했다. 황백은 한우의 자궁 세척액 및 정액에서 분리된 20종의 균 중 총 19종의 균에 항균효과를 보였다. 0.01 g/mL의 농도에서는 거의 효과가 없었지만 0.1 g/mL과 1 g/mL에서 다른 4가지의 추출물과 비교해 항균효과가 가장 우수했으며, 농도가 높아짐에 따라 항균효과도 증가되는 양상을 나타냈다. 이는 국내 시판되는 허브류 추출물의 농도가 증가함에 따라 항균효과 또한 증가한다는 이전의 결과와 유사했다. 황백 내 성분중의 하나인 berberine은 0.6 ~ 2.5 % 정도를 함유하며 항염증, 살균, 항암, 항균 등의 효과가 있는 것으로 알려져있다. 황백이 *Lactobacillus* subsp., *Salmonella* subsp. 및 *E. coli*에 항균효과가 있다는 이전 보고와 유사하게 본 연구에서도 한우의 자궁 세척액 및 정액 내에서 분리된 세균총에 대해서 항균효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

② 환삼덩굴의 항균효과

환삼덩굴은 환경 위해 식물로 알려진 잡초이자 약용식물이다. 성장이 빠르기 때문에 재배가 용이하여 원료제공 및 비용절감 차원에서 장점을 보일 것으로 기대되고 있다. 환삼덩굴의 항균효과는 황백보다는 비교적 효과가 떨어졌지만 대부분의 균에 대해 항균효과를 나타냈고, 자궁 세척액과 정액 내에서 가장 높은 빈도로 분리된 주요 3가지 균에 대해서 다른 식물 추출물에 비해 높은 항균효과를 보였다. 또한 0.1 g/mL와 1 g/mL의 농도에서 큰 차이가 없었고 오히려 0.1 g/mL에서 항균효과가 더 높았다. 따라서 환삼덩굴은 낮은 농도에서도 항균효과가 우수하기 때문에 경제적이며, 항생제를 대체할 천연물질 후보로 적합하다고 생각된다.

③ 한우의 자궁 내 분리 세균에 대한 천연물질 항균효과

결론적으로 본 연구에서 우수한 항균효과를 보인 황백과 환삼덩굴 추출물은 특정 세균이 아니라 자궁 내 분리된 모든 세균총에서 우수한 항균효과를 나타내었고, 더욱이 자궁 내 분리 세균 중, 소에게 병원성을 나타낼 수 있는 *S. uberis*나 *E. rhusiopathiae*에 대해서도 황백은 우수한 항균효과가 있었고 환삼덩굴은 *S. uberis*에 우수한 항균효과를 보였다(Table 3). 또한, 항균효과 외에도 기존에 보고된 긍정적인 효과로 인해 자궁 내 환경을 개선하여 수태율의 향상을 가져올 것으로 기대된다.

④ 한우의 자궁 내 분리 세균에 대한 기존항생제와 천연물질의 항균효과 비교

천연물질 추출물의 항균효과가 어느 정도 인지를 알아보기 위하여 기존에 사용되고 있는

항생제중 우터린 보러스와 메트리큐어를 가지고 항생제 감수성 시험을 하였다. 우터린 보러스는 자궁 내 세척의 용도로 사용되고 있으며, Sulfamethazole, Sulfathiazole, Urea가 함유되어 있는 붉은색의 고체 알약을 PBS에 녹여 사용하였다. 메트리큐어는 500mg의 Cephaprin과 19g의 부형제가 섞여 판매되고 있는 액체 상태의 것을 그대로 사용하였다. 감수성 검사 방법은 위의 천연물질 감수성 검사 방법과 동일하다.

검사 결과, 원액을 가지고 실험한 메트리큐어의 항균효과가 가장 뛰어난 것을 확인 할 수 있었고, 소독용으로 사용하는 우터린 보러스와 황백의 효과가 비슷한 경향을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 아쉽게도 환삼덩굴은 효과가 미미 했으나, 이전의 환삼덩굴의 농도별 항균효과 시험에서 1g/ml보다 0.5g/ml의 농도에서 좀 더 효과가 있었으므로 추가실험을 통해 적정 농도를 찾아내는 것이 필요해 보인다.

이처럼 천연물질 추출물은 기존에 사용되는 항생제만큼 한우의 자궁이나 정액에서 분리된 균에 대해 우수한 항균효과를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 이용해 자궁내 세균으로 인한 한우의 저수태우 문제를 해결할 수 있는 안전한 치료제 개발이 될 수 있도록 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 현재 상용화되어 사용되는 자궁세척용 항생제의 경우 효과면에서 다소 뛰어난 것으로 나타났지만 이는 사용한 농도가 높았기 때문이라 생각되며 실제 임상에 적용하는 양은 이보다 적기 때문에 효과는 본 과제에서 개발한 항균효과보다 훨씬 낮으리라 판단된다. 또한 우터린보러스와 메트리큐어의 사용은 소에 항생제 남용가능성으로 인한 항생제 내성균주의 발생가능성으로 이에 대한 대안으로 본 연구결과물과 같은 천연물질의 사용이 권장되어야 할 것으로 생각된다(Table 4, 5, 6).

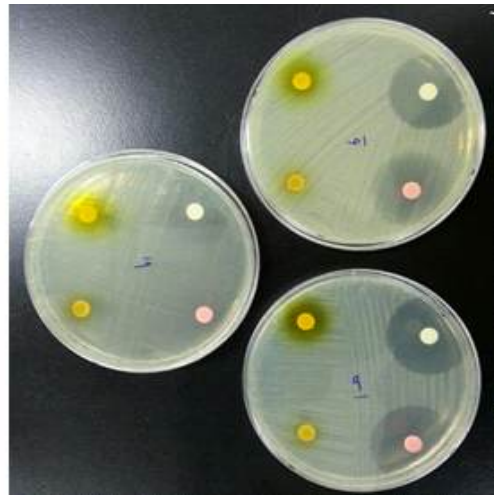
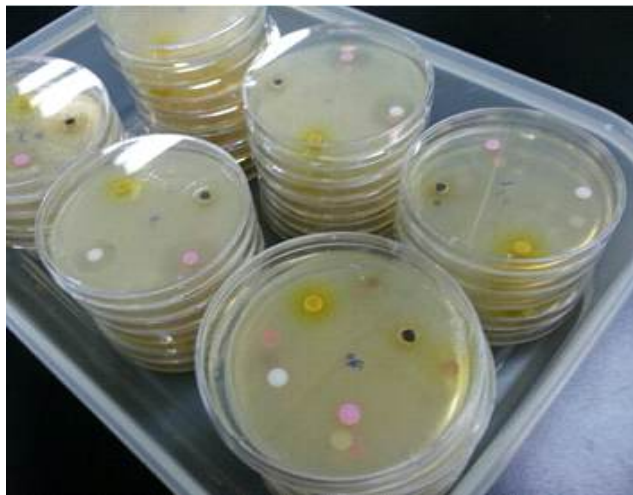


Table 3. Antimicrobial effect of each extracts against difference bacterial strains

No.	Bacterial strains	Diameter of clear zone(mm)					
		<i>Phelledendronamurensis</i> (<i>황박</i>)			<i>Humulus japonicus</i> (<i>환삼덩굴</i>)		
		Conc.(g/ml)					
		1	0.1	0.01	1	0.1	0.01
1	<i>Bacillus lentus</i>	+++	+	-	++	++	+
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	+++	+	-	-	-	-
3	<i>Bacillus pumilus</i>	++	+	-	+	++	-
4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+++	+	-	+	++	+
5	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+++	++	-	-	-	-
6	<i>Granulicatella elegans</i>	+++++	++++	-	+++	+++	++
7	<i>Kocuria kristinae</i>	+++++	++++	++	-	-	-
8	<i>Kouria rosea</i>	++++	+++	-	+	-	-
9	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	+++	++	-	++	++	-
10	<i>Pantoea spp</i>	+++	++	+	+	++	+
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
12	<i>Serratia plymuthica</i>	++	-	-	-	-	-
13	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	+++	-	-	+	++	-
14	<i>Staphylococcus hominis</i>	++++	++	-	-	-	-
15	<i>Staphylococcus lentus</i>	++	+	-	+	++	+
16	<i>Staphylococcus sciuri</i>	++	-	-	-	-	-
17	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	++	-	-	++	-	-
18	<i>Staphylococcus xylosus</i>	++++	+	-	++	-	-
19	<i>Streptococcus infantarius ssp coli</i>	+++	-	-	+	++	-
20	<i>Streptococcus sanguinis</i>	++++	++	-	++	++	-
21	<i>Streptococcus uberis</i>	++++	++	-	+++	+++	+

The-, no inhibitory zone; +, <10 mm; ++, <15 mm; +++, <20 mm; +++++, <25 mm; ++++++, >25 mm.

Table 4. Antimicrobial effect of natral extracts and commercial antibiotics against difference bacterial strains isolated from normal Hanwoo uterus flushing

No.	Bacterial strains	Diameter of clear zone(mm)			
		Natural extracts		Commercial antibiotics	
		<i>Phelledendronamurens</i>	<i>Humulus japonicus</i>	Metricure	Uterine Boluses
1	<i>Streptococcus infantarius ssp. coli</i>	+++	-	+++++	-
2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	++++	+	+++++	-
3	<i>Granulicatella elegans</i>	++++	+	+++++	++++
4	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+++	+	+++++	++++
5	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+++	+	+++++	+++
6	<i>Staphylococcus lentus</i>	++	-	+++++	+++++
7	<i>Bacillus lentus</i>	++++	++++	++	-
8	<i>Bacillus pumilus</i>	+++	-	+++++	+++++
9	<i>Pantoea spp.</i>	+++	-	+++++	+++++
10	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	++	-	++++	+++++
11	<i>Serratia plymuthica</i>	+	-	+++++	++++
12	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	++	++	+++++	+++
13	<i>Staphylococcus xylosus</i>	+++	+	+++++	++++
14	<i>Staphylococcus sciuri</i>	++	-	+++++	+++++
15	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+	++	+++
16	<i>Bacillus licheniformis</i>	+++	+	+++	++++
17	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	+++	-	+++++	+++++

The-, no inhibitory zone; +, <10 mm; ++, <15 mm; +++, <20 mm; +++++, <25 mm; ++++++, >25 mm.

Phelledendronamurens, *Humulus japonicus*, Uterine Boluses; Conc.= 1g/ml, Metricure= 25mg/ml.

Table 5. Antimicrobial effect of natral extracts and commercial antibiotics against difference bacterial strains isolated from repeat breeder cow (RBC) uterus flushing

No.	Bacterial strains	Diameter of clear zone(mm)			
		Natural extracts		Commercial antibiotics	
		<i>Phelledendronamurens</i> e	<i>Humulus japonicus</i>	Metricure	Uterine Boluses
1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	++++	+	+++++	-
2	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	+++	+	+++++	+++
3	<i>Granulicatella adiacens</i>	++	+	+++++	+++++
4	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+	++	+++
5	<i>Enterobactor aerogenes</i>	-	-	-	++
6	<i>Rothia mucilaginosa</i>	++	+	+++	++++
7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	++	++	++	++
8	<i>Alloiococcus otitis</i>	++++	++	+++++	-
9	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	+++	-	+++++	+++
10	<i>Streptococcus alactolycus</i>	++	-	+++++	+++++
11	<i>Pasteurella canis</i>	+++++	++	+++++	+++++

The-, no inhibitory zone; +, <10 mm; ++, <15 mm; +++, <20 mm; +++++, <25 mm; ++++++, >25 mm.
*Phelledendronamurens*e, *Humulus japonicus*, Uterine Boluses; Conc.= 1g/ml, Metricure= 25mg/ml.

Table 6. Antimicrobial effect of natral extracts and commercial antibiotics against difference bacterial strains isolated from Hanwoo semen

No.	Bacterial strains	Diameter of clear zone(mm)			
		Natural extracts		Commercial antibiotics	
		<i>Phelledendronamurens</i>	<i>Humulus japonicus</i>	Metricure	Uterine Boluses
1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	++++	+	+++++	-
2	<i>Kocuria kristinae</i>	++++	-	-	-
3	<i>Streptococcus uberis</i>	+++	++	+++++	+++
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++++	+++++	++
5	<i>Streptococcus sanguinis</i>	+++	++	+++++	+++
6	<i>Staphylococcus homonis ssp.hominis</i>	+++	-	++++	-
7	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	++	-	++++	++++
8	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	++
9	<i>Eschericha coli</i>	-	-	-	-
10	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	++++	+++	+++++	+++++
11	<i>Oligella ureolytica</i>	++++	-	+++++	-
12	<i>Kocuria varians</i>	+++	+	+++	-
13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	++	++	++	++

The-, no inhibitory zone; +, <10 mm; ++, <15 mm; +++, <20 mm; +++++, <25 mm; ++++++, >25 mm.
Phelledendronamurens, *Humulus japonicus*, Uterine Boluses; Conc.= 1g/ml, Metricure= 25mg/ml.

3. 한우 자궁 내에 천연물질 처리 후의 미생물총 변화

(1) 실험방법

① 동물실험

2015년부터 강원도 횡성에 위치한 한우 사육농가의 암소18두를 실험동물로 사용하였다. 실험군은 모두 6군으로, 황백 추출물을 1:100, 1:1000, 1:10000으로 희석하여 주입한 그룹과 환삼덩굴을 1:100, 1:1000, 1:10000의 농도로 희석하여 주입한 그룹으로 구성되었다. 멸균된 증류수를 이용하여 관류채취하고 20ml의 천연물질 희석액을 주입하였다. 3, 6, 9일차별로 다시 관류채취하여 자궁 세척액 샘플을 채취하였다.

② 균분리 및 동정

균분리 및 동정 방법은 위의 방법과 동일하다.

(2) 한우 자궁 내 천연물질 처리 후, 미생물총 변화 결과

① 샘플링 결과

동물실험 결과, 총 58개의 자궁 세척액 샘플을 얻었다. 실험은 황백과 환삼덩굴을 1:100으로 희석하여 각 3마리씩 실험에 사용하였고, 각 한마리씩 3, 6, 9일차에 다시 자궁세척액을 얻었다. 실험도중 황백 1:100 희석액을 주입한 소 한 마리가 도태되어 샘플을 얻지 못하였기에 황백 1:100희석군에서 4개, 환삼덩굴 1:100 실험군에서 6개의 자궁세척액을 이용해 실험에 사용하였다. 황백과 환삼덩굴 1:100 희석액의 실험을 토대로 문제점을 보완하여 1:1000과 1:10000 희석액을 이용한 실험을 다시 설계하고 진행하였다. 황백과 환삼덩굴의 농도별로 각 3마리씩 실험에 사용하였고, 각각 동일 개체에서의 3, 6, 9일차별 자궁세척액 샘플을 확보하여 황백 1:1000희석액 12개, 1:10000희석액 12개 그리고 환삼덩굴 1:1000희석액 12개, 1:10000희석액 12개로 1:1000총 48개의 자궁 세척액을 실험에 사용하였다. 이해를 돕기 위해 표로 나타내었다(Table. 7).

Table 7. Sample number of the uterus lavage fluid

sampling date	<i>Phelledendron amurense</i>			<i>Humulus japonicas</i>		
	1:100	1:1000	1:10000	1:100	1:1000	1:10000
0	2	3	3	3	3	3
3	0	3	3	1	3	3
6	1	3	3	1	3	3
9	1	3	3	1	3	3

② 균분리 결과

총 58개의 자궁세척액 샘플을 Blood agar와 MacConkey agar에 접종하여 균을 분리하였다. 분리된 균은 균의 색, 모양, 집락의 크기, 투명도, 용혈성 여부, 자라는 양상에 따라 육안으로 구분하였다. 그 결과, 1:100 실험에서 25종, 1:1000, 1:10000에서 94종을 분리하여 총 119종의 균을 분리하였다. 동시에 균 수도 측정하여 기록하였고, 희석배율을 고려하여 환산한 결과를 표로 나타내었다(Table. 8).

③ 균 수 측정 결과

기대했던 것과 달리, 황백과 환삼덩굴 추출물의 1:1000, 1:10000 희석액은 균 수 감소에 큰 영향을 미치지 못하였다. 심지어, 천연물질 처리 전인 0일차보다 천연물질을 가한 3일차에서 균수가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 샘플의 부재로 정확한 정보를 도출하기는 힘들지만, 환삼덩굴과 황백의 1:100 희석액은 천연물질을 처리하기 전인 0일차에 비해 천연물질을 처리하고 난 뒤인 3, 6, 9일차의 샘플에서 더 적은 수의 균이 검출되는 것을 확인할 수 있었다(Table. 8).

④ 그람 양성 및 음성균 조사 결과

Blood agar와 MacConkey agar에 접종하여 분리해 낸 총 119개의 균을 vitek II 이용을 위해 그람염색을 실시 하였고, 이를 통해 그람 양성 및 음성균 그리고 그람 양성이거나 음성이면서 간균인 균 등 3가지로 분리하였다. 그람 염색을 통해 같은 균이라 생각이 되는 균은 다시 동일 균으로 분류하였으며, 분리균 중 소수(4 종)는 계대배양에서 자라지 않아 실험에서 제외되었다. 그 결과 분리균은 그람 양성균은 총 29종, 그람 음성균은 총 31종, 그람 양성이거나 음성이면서 간균은 총 22종이 분리되어 총 82종으로 간추려졌다.

⑤ 한우 자궁내 천연물질 처리 후 미생물총 변화

균 수 측정 결과에서는 예상했던 것과는 달리 유의적인 효과를 보이지 않았다. 1:1000, 1:10000희석액의 결과에서는 황백과 환삼덩굴 모두에서 아무런 항균효과도 보이지 않았으며 오히려 천연물질 추출액을 투여하고 난 뒤에 균 수가 더 크게 증가하는 모습을 보였다. 이는 갑작스런 자궁 내 환경의 변화로 세균총에 변화가 생기거나 실험 과정에서 샘플의 오염으로 인한 문제일 수 있다. 더욱이 분리되는 균 중 *Acinetobacter lwoffii*는 피부에 서식하는 정상세균총이고, *Granulicatella adiacens*는 인간의 호흡기에 서식하는 정상세균총 이며, *Sphingobacterium thalpophilum*는 토양에 서식하는 정상세균총이고, *Staphylococcus xylosus*는 사람과 동물의 피부공생균이자 발효균이었던 점을 생각하면 소들이 휴식을 취하거나 생활하면서 흙이나 사람과의 접촉으로 인해 획득한 균일 가능성이 있었다.

Table 8. Colony forming unit(CFU) of the washing fluid of the uterus in Hanwoo

sampling date	<i>Phelledendron amurense</i>			<i>Humulus japonicas</i>		
	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml	CFU/ml
	1:10000	1:1000	1:100	1:10000	1:1000	1:100
	10	180	1080	530	50	1570
0	70	40	100	330	20	10
	600	10		10	960	70
sum	680	230	1180	870	1030	1650
	10	150	-	13600	5500000	-
3	215000	10	-	1120	191000	10
	380	14000		420	4000	-
sum	215390	14160	-	15140	5695000	10

	20	0	-	270	8200	-
6	2740	220	0	40	330	-
	2120	1100000		0	100000	40
sum	4880	1100220	0	310	108530	40
	10	0	-	30	1070	1000
9	10	0	80	90	26000	-
	380	30		40	1800000	-
sum	400	30	80	160	1827070	1000

Table 9. The change of the bacteria flora from the uterus in Hanwoo when injected extract of the *Phelledendron amurense*

sampling date	<i>Phelledendron amurense</i>		
	1:10000	1:1000	1:100
0	Acinetobacter lwoffii, Bacillus licheniformis, Kocuria rosea, Staphylococcus xylosus, Streptococcus pneumoniae, Virgibacillus pantothenicus	Bacillus pumilus, Enterococcus faecalis, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus heamolyticus	Escherichia coli, Sphingomonas paucimobilis
3	Bacillus licheniformis, Escherichia coli, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus heamolyticus	Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Escherichia coli	-
6	Escherichia coli, Paenibacillus polymyxa, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus xylosus, Staphylococcus lentus, Virgibacillus pantothenicus	Escherichia coli, Sphingomonas paucimobilis	-
9	Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus xylosus	Staphylococcus gallinarum	Staphylococcus xylosus

Table 10. The change of the bacteria flora from the uterus in Hanwoo when injected extract of the *Humulus japonicas*

sampling date	<i>Humulus japonicas</i>		
	1:10000	1:1000	1:100
0	Bacillus pumilus, Sphingobacterium thalpophilum, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus xylosus	Acinetobacter Iwoffii, Bacillus pumilus, Brucella melitensis , Pseudomonas stutzeri, Sphingobacterium thalpophilum, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus lentus	Granulicatellaadiacens, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus xylosus
3	Bacillus clausii, Bacillus licheniformis, Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus chromogenes, Staphylococcus lentus, Streptococcus infantarius subsp. Coli	Escherichia coli, Staphylococcus chromogenes	Granulicatellaadiacens
6	Sphingomonas paucimobilis	Escherichia coli, Staphylococcus chromogenes	Acinetobacter Iwoffii
9	Sphingobacterium thalpophilum, Sphingomonas paucimobilis	Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus chromogenes, Staphylococcus sciuri	Sphingomonas paucimobilis, Staphylococcus equorum, Staphylococcus vitulinus

또한 세균 수 측정 결과는 유익균과 유해균을 구분하지 않고 모두 합산하여 나타낸 자료이기에 단순히 세균의 수만 비교해서는 천연물질이 효과가 있는 것인지 없는 것인지를 도출하기에는 부적절하고 판단하였으며, 따라서 그람 염색과 Vitek II를 이용한 동정을 실시하였고 동정된 균들을 샘플의 종류에 따라 (table 3, 4)로 정리하여 작성하였다.

동정 결과, 몇몇 균은 병원성을 일으킬 수 있는 균이었는데 황백 1:0000 실험군에서 0일차와 6일차에 발견되는 *Virgibacillus pantothenicus* 는 사람에게 간종양이나 폐혈증을 일으킬 수 있는 기회감염균이었고, 황백 1:1000 실험군에서 0일차와 3일차에 발견되는 *Bacillus pumilus* 는 인간에게는 드물게 감염되기도 하며 주로 새우에게 독성을 나타내고 식중독을 일으킬 수 있는 균이며 동시에 질소고정능력도 가진 균이었다. 또한 황백 1:1000 실험군에서 0일차에만 발견되는 *Enterococcus faecalis* 와 같은 경우는 인간에게 감염시 식중독과 심내막염, 요로결석, 만성치주염 등을 일으킬 수 있는 치명적인 균이고, 황백 1:10000 실험군의 0주차에서 발견되었던 *Streptococcus pneumoniae* 는 인간에게 감염시 폐렴, 폐혈증, 이염이나 뇌수막염을 일으키는 균이었다. 주로 병원감염으로 사람에게 감염되며 폐혈증, 뇌수막염, 복막염 등을 일으키는 *Sphingomonas paucimobilis* 는 전체 실험군의 대부분에서 발견이 되었다.

어떤 균은 동물에게 심각한 병원성을 보일 수 있었는데 황백 1:10000 실험군 6일차와 환삼덩굴 1:1000, 1:10000 실험군 0일차에서 주로 발견된 *Staphylococcus lentus* 는 사람과 동물 모두에게 감염되며 염소에게는 유방염을 일으키며 돼지에서는 치명적인 삼포성표피염을 일으킬 수 있는 균이고, 환삼덩굴의 1:1000 실험군에서 많이 분리된 *Staphylococcus chromogenes* 는 소에게 유방염을 일으킬 수 있는 균이다. 환삼덩굴 1:10000 3일차 실험군에서의 *Streptococcus infantarius subsp. Coli* 는 인간과 동물 모두에게 심장내막염, 폐혈증, 암을 일으킬 수 있었고, 환삼덩굴 1:1000 실험군의 0일차에서는 브르셀라병을 일으키는 *Brucella melitensis* 도 분리되었다.

위의 결과를 보면, 1:100 에서보다 1:1000, 1:10000 희석액을 이용한 실험군에서 유해균의 빈도나 종류가 더 많고, 자료에는 보여지지 않았지만 유해균의 CFU도 많은 것으로 보아 희석배수가 높아질수록 유해균의 종류나 그 수는 더 증가하는 경향을 보였다. 이는 황백이나 환삼덩굴이 자궁내에서 항균효과를 나타내기 위해서는 어느 일정 농도 이상이 되어야 효과가 있다는 것을 나타낸다. 또한 황백보다 환삼덩굴의 모든 실험군에서 *Brucella melitensis* 와 *Streptococcus infantarius subsp. Coli* 를 비롯한 더 많은 유해균이 분리된 것으로 보아 환삼덩굴보다는 황백이 조금 더 항균효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 따라서 항생제를 대체할 천연물질로 환삼덩굴 보다는 황백이 더 적합하며, 농도가 1:1000이나 1:10000 정도로 낮은 것 보다는 1:100 또는 더 고농도로 사용하는 것이 유해균을 제어하는데 효과를 보일 것으로 보인다.

아쉬운 점은, 항균효과가 비교적 높았던 1:100 실험군의 개체수가 너무 적어 샘플의 수가 적은 것인데, 1:100보다 고농도의 황백 추출물을 이용하여 더 많은 소에 실험을 진행해 봄으로써 황백이 정말 항생제를 대신하여 세균으로 인한 저수태우 문제를 해결할 수 있을지 확인해 보아야 할 것 같다. 또한 천연물질의 단독 사용 보다는 효과가 좋은 천연물질 추출물을 혼합하여 사용함으로써 좀 더 좋은 항생제 대체제를 개발했으면 한다. 또한, 실제 농가에서 한우에게 천연물질을 처리하였을 때 어떠한 임상증상이 나타나는지를 종합적으로 검토하여 결과를 도출할 필요성이 있다.

4. LPS 투여에 의한 자궁내막염 염증 모델 개발

본 연구 과제로 천연물질인 황백 및 환삼덩굴이 자궁내 다양한 세균의 성장에 효과적으로 작용하여 세균성장을 억제한다는 것을 알았다. 실제로 In vivo의 자궁내막염증 모델에서 이 두 가지 천연물질의 사용이 항염증 효과를 나타내는지 알아보려고 다음의 연구를 실시하였다. 최근 실험실 내에서 실험동물을 이용한 자궁내막염 모델은 2가지로 알려졌다. 첫째는 생균을 복강 내 또는 질 내에 직접 투여하여 자궁에 염증을 유도하는 모델이다. 두 번째는 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 복강 내 또는 질 내에 투여하는 것이다. 그러나 첫째 모델의 경우 실험을 위해 실제 자궁내막염을 일으키는 균을 배양하고 그 배양한 생균의 숫자를 상정한 후 체내에 투여하는 경우로 이 경우는 패혈증을 일으켜 생균 투여 후 2-3일 후 모든 실험동물이 사망할 수 있는 보고되었다. 두 번째 모델인 LPS를 복강 내 투여하는 것으로 자궁내막염을 일으킬 수 있으나 투여 용량 또는 마우스의 상태에 따라 패혈증을 일으켜 마우스가 사망할 수 있다. 이후 소량의 LPS를 직접 자궁 내 투여하여 자궁내막염을 일으키는 모델이 보고되기도 했다. 우리는 LPS를 투여한 자궁내막염 모델에서 천연물질의 항염증 효과를 알아보려고 LPS를 복강 내 투여한 생쥐 모델과 LPS를 자궁 내 직접 투여한 마우스 모델을 이용하였다. 그러나 우리의 예비 실험에서 LPS를 복강 내 또는 자궁 내 직접 투여한 마우스 모두에서 자궁내막염이 일어나지 않는 것으로 나타났다. 그래서 본 연구 과제 수행의 하나의 목적으로 4-1에서 자궁내막염 염증 모델 개발이 주요하다고 판단하였고 과제 수행의 일환으로 자궁내막염 모델의 개발을 추진하였다. 그리고 이어 4-2에서 이 모델에서 천연물질의 염증억제효과를 확인하고 4-3에서는 자궁세포염증에서 천연물질의 효과를 관찰하였다.

(1). 자궁내막염 마우스모델 개발

① LPS의 복강 내 투여와 cytokine의 발현변화 분석

Salmonella 유래 LPS (sigma)를 복강 내 투여 또는 자궁 내 직접 투여한 후 염증유발 단백질의 발현을 면역탁본 측정법 (Immunoblot assay) 즉 western blot assay를 이용하여 측정하였다. LPS 투여법은 다음과 같다. LPS를 저농도 (25mg/kg)와 고농도 (50mg/kg) 등 두 군으로 나눠 C57 black 마우스의 복강 내 100 μ l 씩 투여 후 시간의 경과를 두고 경추탈골 방법으로 마우스를 희생시킨 후 자궁조직을 채취하였다. 채취한 조직은 냉각질소에 잠시 보관 후 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에서 단백질 분리 및 량 보정 전까지 보관하였다. 단백질 발현을 검출하기 위하여 사용한 항체는 IL-1 antibody는 R&D제품, IL-6 antibody는 R&D제품과 Santa cruz TNF- α antibody는 Santa cruz와 Sell signaling을 각각 사용하였고 2차 antibody 또한 동일한 브랜드로 실험을 실시하였다. 이 실험을 위해 마우스 자궁조직에서 단백질 분리 방법을 통해 추출한 단백질을 sample buffer와 lysis buffer를 이용하여 샘플을 만든 뒤 15% 젤을 이용하여 loading 하였다. 이후 단백질은 분리된 상태 그대로 멤브레인으로 옮긴 후 1차 항체를 결합하였다. Over night 한 후 다시 그 항체에 특이적인 2차항체를 6시간 이상 결합한 후 Ecl 형광 검출법을 통해 밴드를 확인하였다.

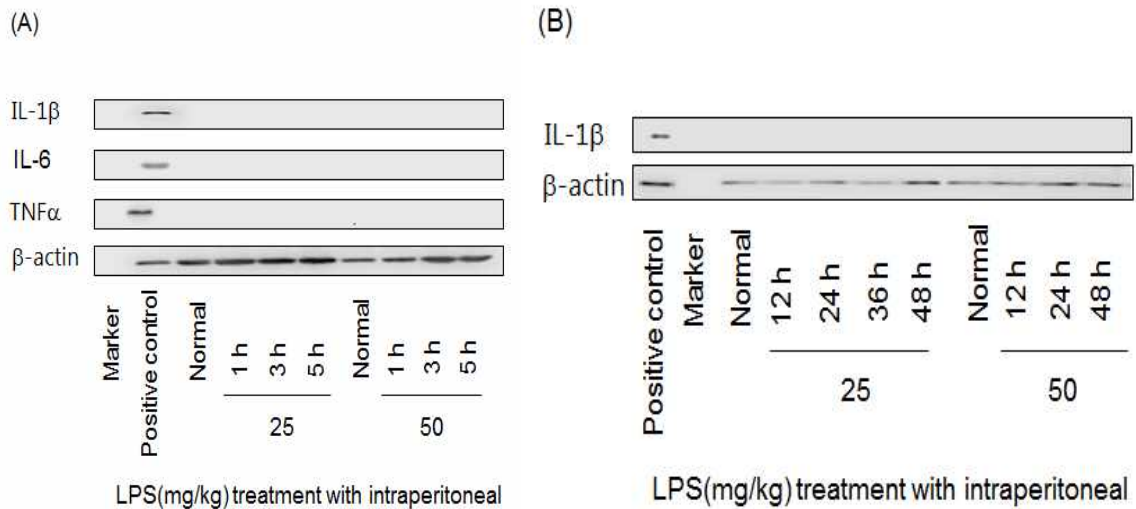


그림 1. 자궁조직에서 cytokine의 발현변화

그림 1(A)에서 보는 바와 같이 LPS를 저농도, 고농도로 복강내 투여하더라도 염증유도 단백질로 알려진 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 변화는 나타나지 않았다. 뿐만 아니라 LPS 투여 후 희생시키기 전까지 투여시간을 연장시킨 군 (B)에서 LPS 투여 후 2일째까지도 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 변화는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 복강 내 LPS는 투여는 자궁 내 염증을 유발 시키지 못하는 것으로 사료되었다. 그래서 LPS를 자궁 내 투여하기 위하여 다음과 같은 방법을 통해 자궁내 직접 투여를 실시하였다. 성선 자극 호르몬 제인 Pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)를 투여 후 48시간 후 발정이 왔을 때 자궁내로 직접 LPS를 투여하였다(그림 2).



얇은 유리관을 돌칼로 2~3cm간격으로 자른 뒤 알콜 램프에 절단한 유리관 끝부분을 가열하여 부드럽게 만들어 준다. 가열 이유 : 마우스 질 내 유리관 삽입 시 질 내막부분 손상을 막기 위함.

그림 2. 자궁내 시약투여법

② 자궁내 LPS 단회 투여 후 1~4일 후 자궁내 cytokine의 발현변화 분석

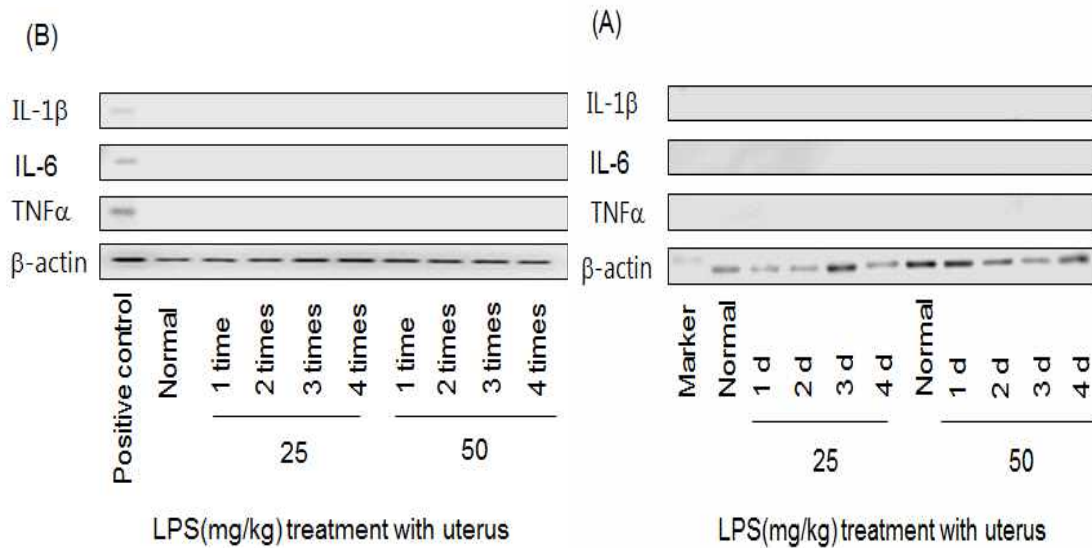


그림 3. 자궁조직에서 cytokine의 발현변화

그림 3(A)에서 보는 바와 같이 LPS를 저농도, 고농도로 자궁 내 투여하더라도 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 변화는 나타나지 않았다. 뿐만 아니라 LPS 2시간 간격으로 2회, 3회, 4회 투여 후 2시간 후 마우스를 희생시킨 군 (B)에서도 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α 의 변화는 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 자궁내 LPS의 직접 투여 또한 자궁 내 염증을 유발 시키지 못하는 것으로 사료되었다. 그래서 본 연구자들은 새로운 자궁내막염 모델을 제작하기 위하여 HCl를 투여하여 자궁내막에 상처를 입힌 후 LPS를 투여하여 염증을 유도하는 모델을 제작하고자 다음의 투여방법으로 HCl과 LPS를 다회 투여하였다. 1M의 HCl을 저농도 (25mg/L)와 고농도(50mg/L)로 희석하여 LPS투여전 자궁내로 전투여(자궁내투여시 50mg/kg) 한후 2시간뒤에 LPS를 4회를 투여하였다.(그림 4)

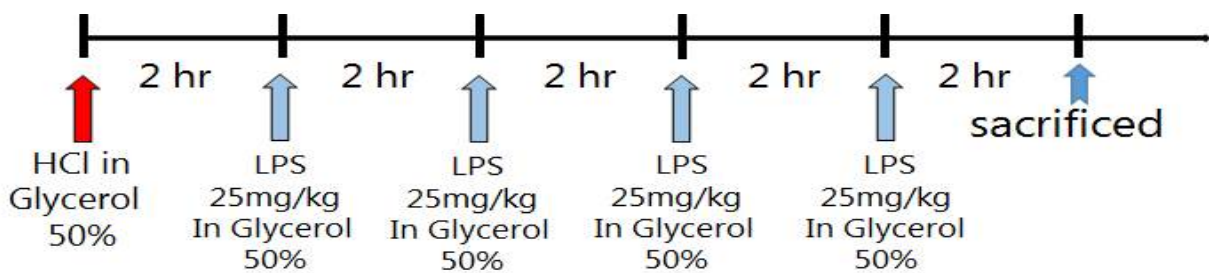


그림 4. 자궁내 염증유도를 위한 HCl과 LPS투여 방법

③ HCl 전투여 및 LPS의 자궁내 4회 중복 투여 후 자궁내 cytokine 발현변화 분석

LPS 투여 2시간 전에 HCl 저농도(25mg/kg)를 단 회 투여한 후 질 내막조직을 손상 시킨 뒤 LPS를 2시간 간격으로 4회 투여하였다.

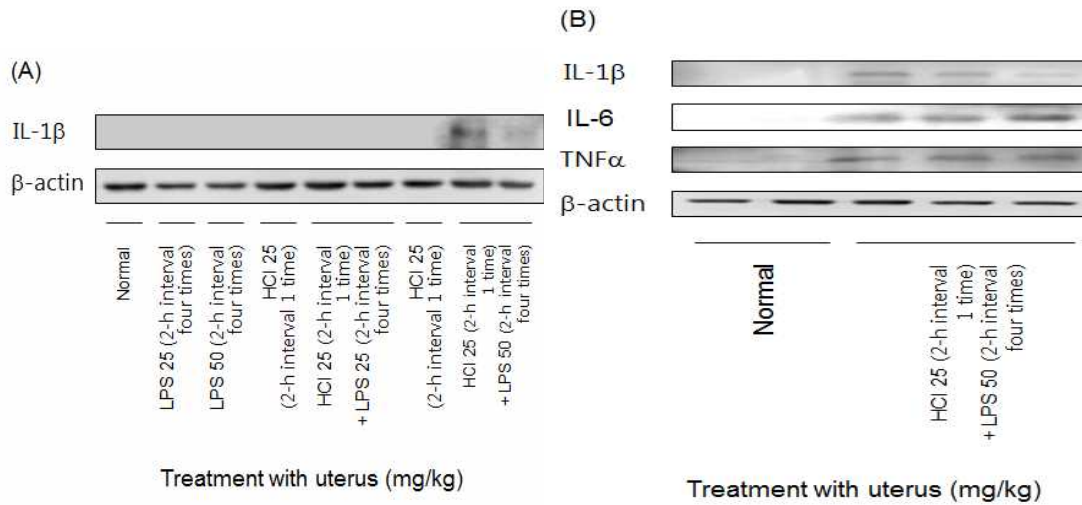


그림 5. 자궁조직에서 cytokine의 발현변화

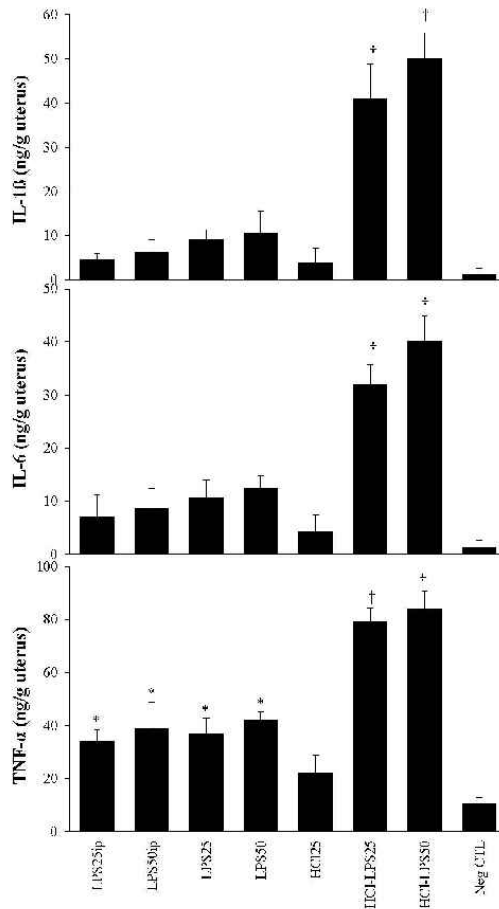


그림 5. 자궁조직에서 각 cytokine의 발현량 변화

그림 5(A)에서 보는 바와 같이 HCl 투여 후 LPS를 고농도로 4회 투여한 군에서 IL-1β의 발현변화의 증가가 확인되었다. (B)에서 (A) 방법을 이용하여 투여 후 확인 한 결과 IL-1β, IL-6, 그리고 TNF-α의 단백질 발현이 모두 유도되는 것으로 확인되었다. 그림 5는 ELISA를 사용하여 조직내의 cytokine의 량의 변화를 관찰한 결과이다. 량의 변화도 조직내 발현변화와 같은 양상으로 cytokine의 량이 증가하는 것으로 나타났다. 그림 6(B)에서와 같이 조

직염색법을 통해 HCl 투여 후 LPS를 고농도로 4회 투여하면 lumen 부위에 호중구의 응집과 자궁내피주위에 호중구의 침착이 관찰되었다.

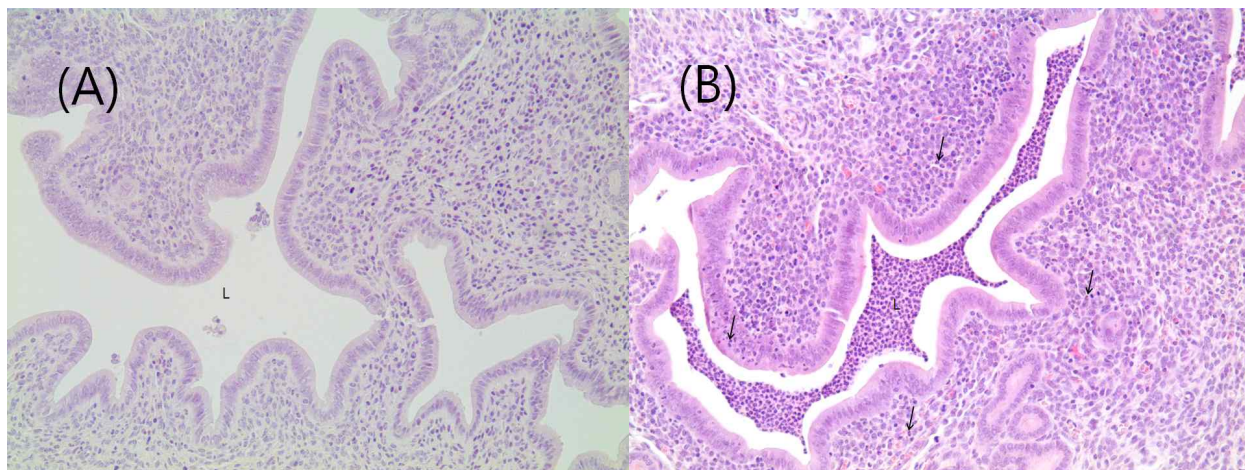


그림 6. 자궁조직의 염증반응

이과 같은 결과는 HCl의 투여 후 LPS를 투여하면 자궁 내 염증을 유발하는 것을 나타낸다. 다음의 table 1과 2은 임상적 증상을 관찰할 스코어의 판단 기준을 보여주며 그 결과를 그림 7과 8에서 나타냈다. HCl의 투여 후 LPS를 투여한 마우스에서 털의 변화(ruffled fur), 움직임의 변화(movement), 눈의 움직임(eye condition), 그리고 반응성(responsiveness)을 합한 결과를 그림 7에 나타냈으며 일반적 염증의 소견은 LPS를 복강내로 투입하였을 경우가 가장 큰 것으로 보인다.

Table 1. Clinical sign scoring criteria

Clinical signs	Score			
	0	1	2	3
Ruffled fur	Normal	Mild; ruffled fur <30% of the body	Moderate; ruffled fur <60% of the body	Severe; ruffled fur >60% of the body
Movement	Normal	Mild; reduced movement and activity <30%	Moderate; reduced movement and activity <60%	Severe; reduced movement and activity >60%
Eye condition	Normal	Mild; eye closed and discharge <30%	Moderate; eye closed and discharge <60%	Severe; eye closed and discharge >60%
Responsiveness	Normal	Mild; reduced responsiveness <30%	Moderate; reduced responsiveness <60%	Severe; reduced responsiveness >60%

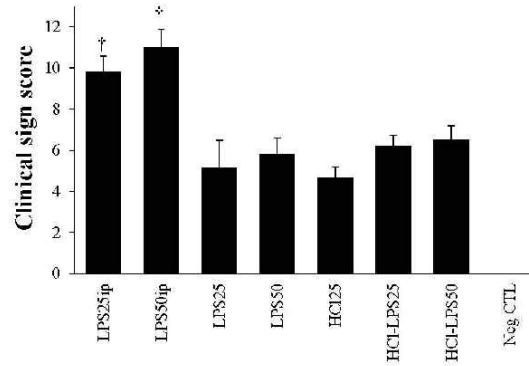


그림 7. 마우스의 염증임상 소견

그러나 조직학적 스코어를 통해 HCl을 먼저 자궁내 투여후 LPS를 자궁내 4회 투여하는 경우가 자궁내 염증을 더 유발하는 것으로 나타났다 (그림 7). 이 결과는 기존의 LPS를 자궁내 또는 복강내 투여하는 경우보다 HCl를 전투여 한 후 LPS를 자궁내 투여하는 경우가 자궁 염증 모델로써 적합하다는 것을 나타낸다.

Table 2. Histopathological criteria

Histopathology	Score			
	0	1	2	3
Inflammation	No sign of inflammation	Low leukocyte infiltration (<30% of the field)	Moderate leukocyte infiltration (<60% of the field)	Severe leukocyte infiltration(>60% of the field)
Necrosis/ Degeneration	Normal	Mild necrosis or degeneration (<30% of the field)	Moderate necrosis or degeneration (<60% of the field)	Severe necrosis or degeneration (>60% of the field)
Congestion/ Hemorrhage	Normal	Mild congestion or hemorrhage (<30% of the field)	Moderate congestion or hemorrhage (<60% of the field)	Severe congestion or hemorrhage (>60% of the field)

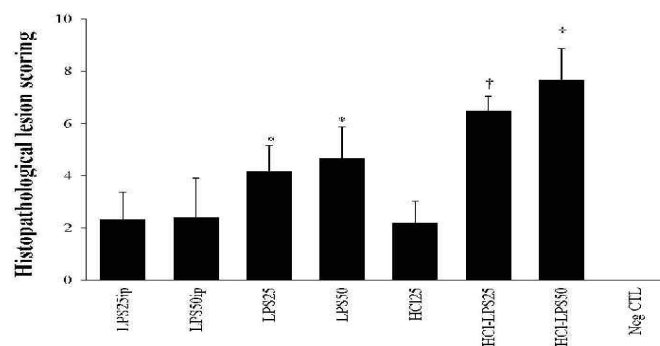


그림 8. 마우스 자궁조직의 염증소견

(2) 자궁내막염 마우스모델에서 천연물질의 항염증효과

① 자궁내막염 마우스모델에서 천연물질의 전투여에 의한 clinical sign scoring의 변화

본 연구과제의 3-1 연구결과를 통해 새롭게 증명되고 개발된 HCl과 LPS 자궁 내 투여 자궁내막염 모델을 이용하여 황백과 환삼덩굴의 염증 억제효과를 알아보고자 다음의 실험을 실시하였다. 황백과 환삼덩굴은 자궁내 투여되었다. 황백과 환삼덩굴의 자궁 내 투여는 HCl 투여 2시간 전에 실시되었다. 각각의 추출물을 20 mg 농도로 자궁 내 2시간 간격으로 2회 주입하였다. Control 군에는 생리식염수를 투여하였다. 2시간 후 HCl를 투여하였고 이후 LPS를 2시간 간격으로 총 4회 투여 후 마우스를 경추탈골로 희생 시킨 후 자궁내 염증 변화를 western blot과 조직염색을 통하여 관찰하였다 (그림 9).



그림 9. 자궁내 염증유도를 위한 HCl과 LPS투여 방법 및 천연물질 전처리

HCl를 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하여 임상적 소견을 스코어하였을 때 염증 정도가 11정도를 나타냈지만 황백(PC-PID)과 환삼덩굴(HJ-PID)를 전투여 하였을 경우 염증스코어가 5에서 6정도로 감소하는 것으로 나타났다 (그림 10).

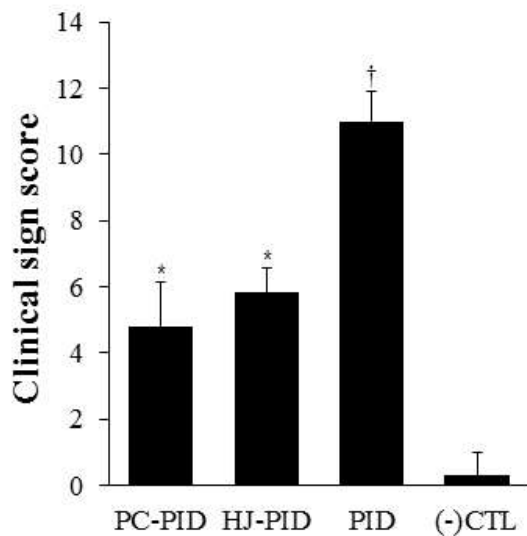


그림 10. 임상소견

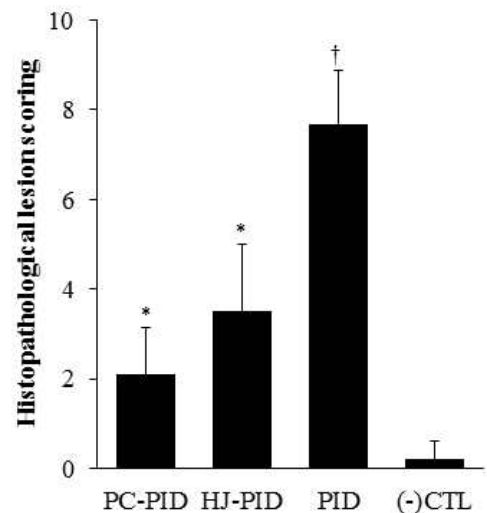


그림 11. 자궁조직의 염증정도

② 자궁내막염 마우스모델에서 천연물질의 전투여에 의한 조직학적 변화

HCl를 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하여 자궁조직의 염증정도를 스코어하였을 때 염증정도가 11정도를 나타냈지만 황백(PC-PID)과 환삼덩굴(HJ-PID)를 전투여 하였을 경우 염증스코어가 2에서 4정도로 감소하는 것으로 나타났다 (그림 11).

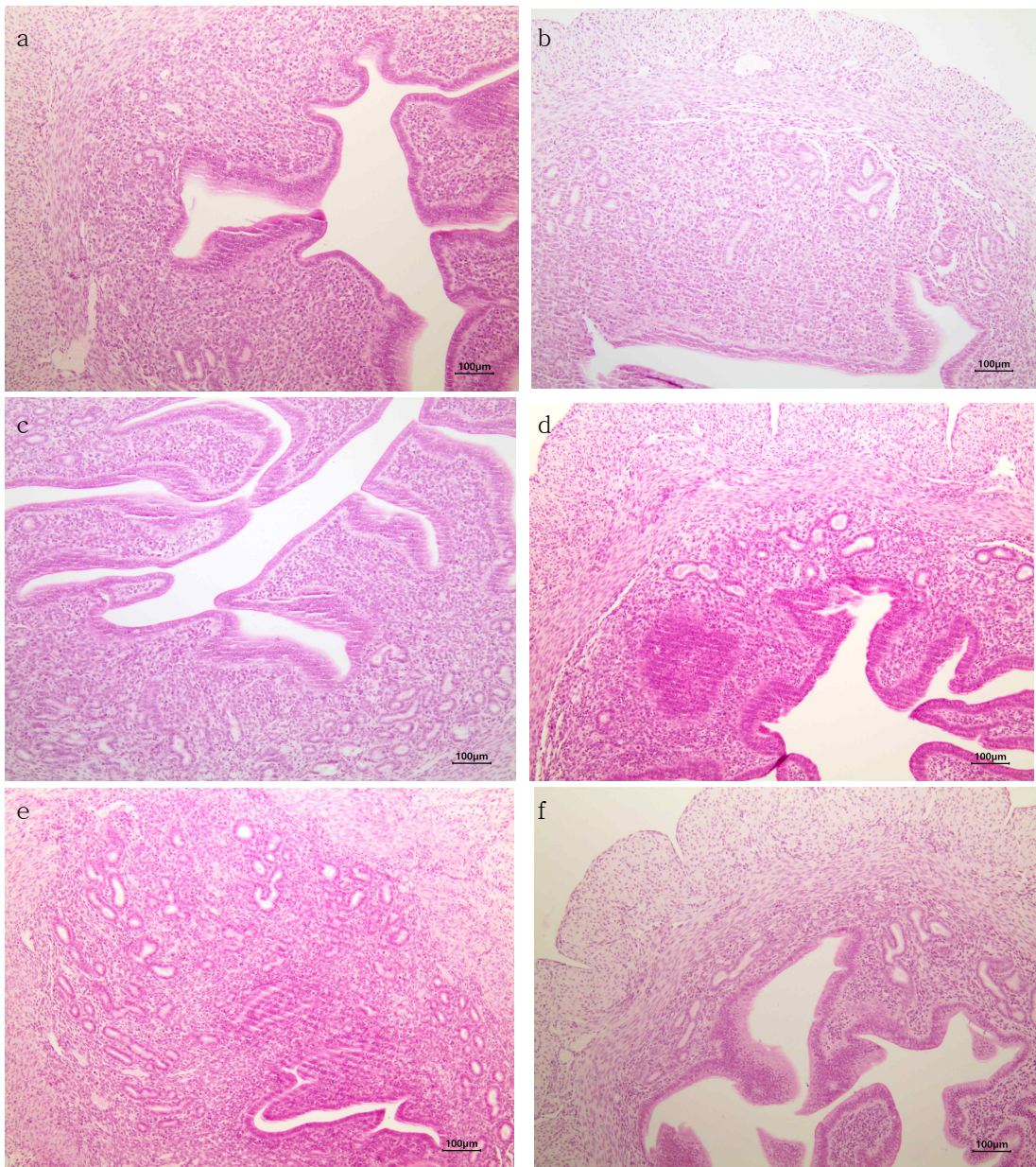


그림 12. 황백 및 환삼덩굴 전처리에 의한 자궁내막염 억제효과

다음은 조직학적 관찰을 통하여 실제 자궁내 염증에 황백과 환삼덩굴이 염증 효과를 갖는지 살펴보았다. 그림 12의 a는 PBS 처치 대조군이며 b는 황백의 전투여 대조군으로 PBS 투여군에서와 같이 조직의 국소 염증반응이 보이지 않고 정상 조직으로 보여지고 있고 c 또한 환삼덩굴투여 대조군으로 PBS 투여군에서와 같이 조직의 국소 염증반응이 보이지 않고 정상조직으로 보여지고 있다. d의 HCl+LPS 처치 염증 양성대조군에서는 조직의 발적, 부종 및 급성 염증반응에서 보여지는 반응과 함께 급성 염증반응에서 주로 출현하는 면역세포의 침윤이 관찰되고 있다. 또한 자궁샘방에서 염증반응에서 반응하여 나타난 단백질성 분비물이 관찰된다.

e는 황백전투여후 HCl+LPS 처치한 군의 조직 사진으로 염증 양성대조군에서 보였던 발적이 없으며 자궁샘방에서 단백질성 분비물은 거의 관찰되지 않고 염증세포의 침윤이 매우

가라앉은 상태로 관찰된다. 또한 f는 환삼덩굴 후 HCl+LPS 처치한 군으로 염증 양성대조군에서 보였던 발적이 없으며 자궁샘방에서 단백질성 분비물은 거의 관찰되지 않고 염증세포의 침윤이 매우 가라앉은 상태로 관찰된다.

③ 자궁내막염 마우스모델에서 천연물질의 전투여에 의한 cytokine의 발현변화
 다음은 western blot 방법을 통하여 자궁조직내 염증 유도 단백질 발현정도를 관찰하였다. HCl를 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하면 자궁 내 염증 유도 단백질 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 유도되는 것이 확인 되었다. 여기에 황백과 환삼덩굴을 전 처리 하였을 경우 IL-1 β 와 TNF- α 의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(그림 13). 이상의 결과로부터 황백과 환삼덩굴은 자궁의 염증을 보호하는 천연물로 판단된다.

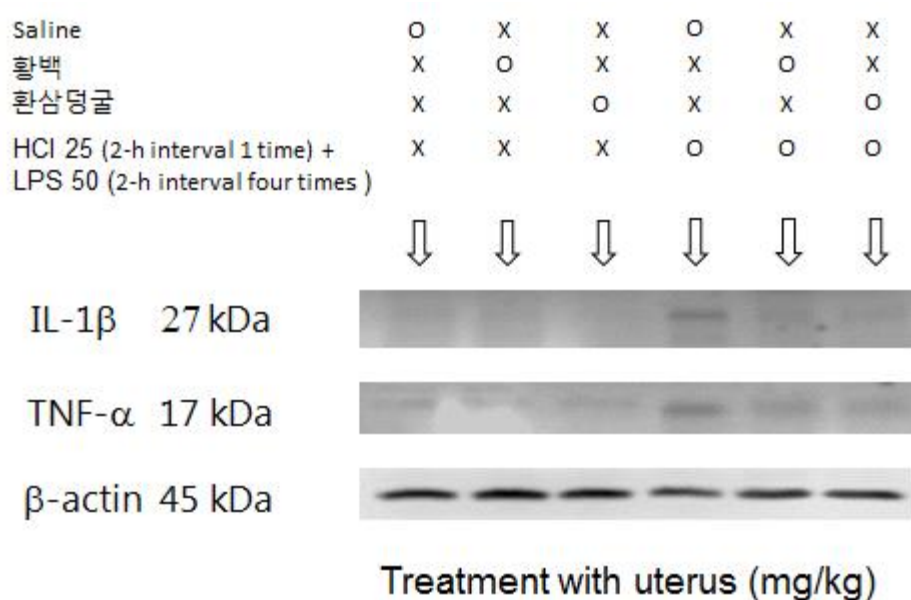


그림 13. 자궁조직에서 cytokine의 발현변화

(3) 자궁상피세포내 염증에 대한 천연물질의 항염증효과

① 자궁상피세포배양

마우스의 자궁으로부터 자궁내 상피세포를 분리하여 자궁상피에서 황백과 환삼덩굴의 염증억제 효과를 관찰하기 위하여 다음과 같은 연구를 실시하였다.

자궁세포 채취에 쓰인 마우스는 6주령 암컷 ICR 마우스를 사용하였다. 구입한 마우스는 구입일로부터 3일 동안 5마리씩 넣어서 실험동물실에서 안정시킨 후에 PMSG를 주사하여 배란을 유도하였다. 2일 후 마우스의 자궁내 상피세포를 채취하였다. 암컷 ICR 마우스를 경추탈구법으로 안락사시킨 후 클린벤치에서 배를 가르고 자궁을 적출하였다(그림 13). 적출된 자궁을 해부판에 올려놓고 자궁을 가위로 세로축의 반을 절제하고 절제한 자궁은 10% Hank's balanced salt solution (HBSS, gibco by life technologies)가 담겨진 지름 6cm의 cell culture dish (Falcon)에 옮겨 담았다. 그 후에 2 mg/ml로 희석한 collagenase type I (gibco by life technologies) 100ul를 잘려진 자궁과 자궁관에 피펫을 이용하여 넣은 후에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 조건의 인큐베이터에서 1시간동안 처리하였다. 그 후, 자궁과 자궁관을 전부

반으로 자르고 cell scraper (SPL)로 자궁 내부를 긁어내었고, 피펫을 이용하여 세포를 수거하여 통과넓이 40um cell strainer (SPL)를 통과시킨 후, 10% HBSS가 담긴 50ml conical tube (SPL)에 담아 2회에 걸쳐 1500rpm에서 원심분리 하여 위싱을 해주었다. 상층액을 제거한 뒤 10% fetal bovine serum (FBS)와 1%의 penicillin - streptomycin (HyClone)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 ham (DMEM/F-12, Sigma life science) 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포가 배양된 배지는 2일마다 새로운 배양액으로 교환해 주었고, 일주일간 배양된 세포를 이용하여 실험을 진행 하였다.

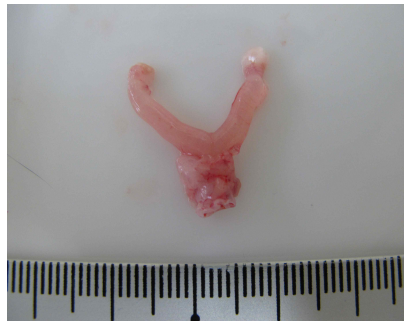


그림 13. 마우스자궁조직

② 자궁상피세포내 염증에 대한 천연물질의 항염증효과

배양된 상피세포에 LPS를 투여하기 전 황백과 환삼덩굴을 각각의 농도로 1시간 전처리한 후 LPS로 30분간 자극후 세포 배양액에서 두 종류의 염증유도 단백질량을 ELISA법을 이용하여 측정하였다. LPS를 자극하였을 경우 배양액내의 TNF- α 와 IL-1 β 농도가 유의성있게 증가하는 것을 보였다(그림 14). 그러나 황백 및 환삼덩굴을 1시간 동안 전처리한 세포의 배양액내에서 두 종류의 cytokine의 양은 유의성 있게 감소하였다.

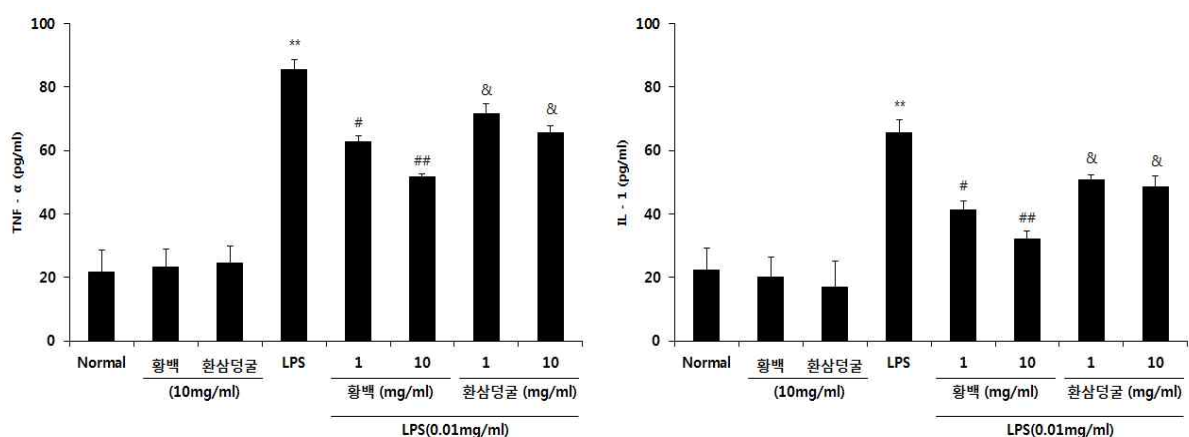


그림 14. 자궁상피세포배양액에서 cytokine량의 변화

제 3 절 2협동과제 연구수행 내용 및 결과

1. 연구개발 수행방법

(1) 1차 년도

한우 체외수정란의 배반포 발달 조사 및 자궁 내막세포에서 임신 및 세포사멸관련 유전자의 발현 양상 분석 수행. 체외성숙과 수정 후 체외배양 과정에서 24 시간 동안 세포사멸 억제제(E-64)를 처리하여 생산된 한우 배반포를 이용하여 동결/융해 후 생존율 및 배반포 발달율을 분석하였음. 또한, 생산된 배반포를 이용하여 세포사멸 양상을 TUNEL assay와 real-time RT-PCR 방법을 이용하여 수행함. 또한, 도축장에서 정상 난소와 난소 낭종을 가진 자궁을 회수하여 자궁내막세포를 추출한 다음, 각각의 자궁내막세포에서 단백질을 추출하여 세포사멸과 착상 관련 단백질들의 발현 양상을 Western blot 분석 방법을 통해 단백질수준에서 확인함.

(2) 2차 년도

천연물질이 한우 생식세포의 번식생리에 미치는 영향 분석 및 효율적 생산에 관한 지속적인 효과 검증. 체외수정 시기에 환삼덩굴 및 황백 추출액 처리(0, 0.01, 0.05 그리고 0.1 μ g/ml)에 따른 정자의 운동성과 배지에서의 ROS 수준을 DCHFDA 염색 기법을 통해 현광현미경 하에서 관찰함. 또한, 체외수정 시기에 환삼덩굴 추출액 농도에 따른 수정을 유도한 후 orcein 염색을 수행하여 정상 및 다정자 수정 여부 및 배반포로의 발달 양상을 대조군과 비교 분석함. 또한, 환삼덩굴 및 황백 추출액의 처리 후 수정유도 후 2일째에 난할을 확인 및 7일째 배반포 형성율과 TUNEL 분석을 통해 배반포의 질적 수준을 분석함으로 지속적인 효과를 검증함.

(3) 3차 년도

한우 체외수정란의 배양과정 동안 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 추출액 처리 농도와 병행 처리에 따른 배반포의 발달효율, 질적수준 향상, ROS 제거 능력 검증 및 세포사멸에 있어서의 긍정적인 효과 검증을 위한 연구 수행.

① 도축장으로부터 채취한 미성숙난자를 이용한 체외성숙 후 수정을 유도한 다음 배반포로의 발달 과정 동안 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 추출액 처리하여 한우 체외수정란의 배반포로의 발달 효율을 조사함. 환삼덩굴의 처리 농도는 2차년도 연구 수행을 통하여 0.001 μ g/ml의 농도를 선택하여 7일 동안 처리하여 배반포 발달율을 확인하였음. 황백 추출액의 처리농도는 0.01, 0.05, 0.1 μ g/ml 단위로 각각 처리하여 대조군과 처리군에서 배반포로의 발달 효율을 조사하였음.

② 한우 수정란의 체외배양 시 적정 농도의 환삼덩굴(0.01 μ g/ml)과 황백(0.01 μ g/ml) 추출액의 병행처리에 의해 생산된 배반포의 질적 수준 분석을 TUNEL 분석과 세포사멸 유전자인 caspase 3 유전자의 면역형광 염색 방법을 이용하여 확인함. 또한, 세포사멸감소의 효과에 대한 대조군으로 멜라토닌 (0.1 μ M)을 처리하여 배발달을 관찰함으로써 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 세포사멸 감소 효과를 비교 분석하였음.

③ 한우 체외수정란의 체외배양에 있어서 환삼덩굴 및 황백 추출액 처리에 의한 ROS 제거 능력을 확인하기 위해서 ROS를 DCHFDA 염색 기법을 통해 형광현미경 하에서 관찰함. 또한, ROS 제거 능력이 있다고 알려진 멜라토닌을 대조군으로 처리하여 환삼덩굴 및 황백 추출액 병행처리에 따른 ROS 제거 능력을 비교 분석함.

2. 연구개발 수행결과

(1) 1차 년도

한우 체외수정란 생산과 생산된 배반포의 동결/융해 후 생존에 있어서 세포사멸 억제제 (E-64) 처리 효과를 분석함. 그 결과 세포사멸 억제제(E-64)의 처리는 한우 체외수정란의 배반포로의 발달율을 증가시키며 동결/융해후 생존부화율을 증가시키는 효과(표 1) 및 세포사멸 유전자들의 발현이 감소되는 것을 검증하였음. 또한, 정상 및 비정상 난소를 가진 자궁내막세포에서 세포사멸 및 임신관련 단백질의 발현 패턴을 분석하였음(그림 1, 2). 이러한 결과를 바탕으로 정상 난소와 난소 낭종을 가진 자궁 내막에서의 다양한 단백질의 발현의 차이로 인해 수태율의 차이로 나타날 수 있다는 결과를 제시함. 따라서 본 연구 결과들은 한우 체외수정란 생산 과정에서 세포사멸의 중요성과 자궁 내막세포에서 단백질의 발현과 임신과의 상관관계에 대한 중요성을 제시하는 연구를 수행하였음.

표 1. E-64 처리에 의해 체외에서 생산된 한우 배반포의 초 급속 동결/융해 후 생존 및 부화율의 비교

E-64 (μ M)	No. of embryos cryopreserved	No. (%) of embryos survived	No. (%) of embryos hatched
0	100	82 (82.5 \pm 5.8) ^a	48 (48.2 \pm 4.6) ^a
0.5	100	88 (87.9 \pm 3.6) ^b	56 (56.8 \pm 5.9) ^b

($p < 0.05$)

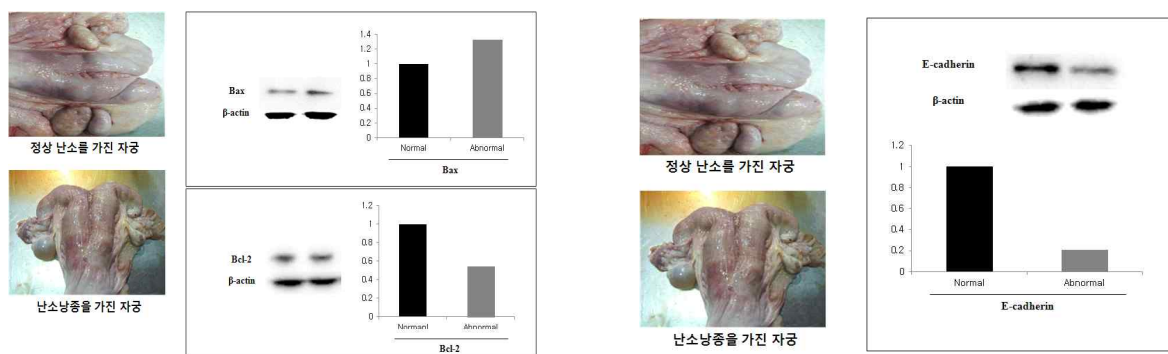


그림 1. Western blot 분석에 의한 세포 사멸 양상

그림 2. Western blot 분석에 의한 임신 관련 유전자 발현 양상

(2) 2차년도

소 정자의 활동성 및 체외수정 양상 및 배발달에 있어서 환삼덩굴 추출액 처리 효과 및 체외수정 시 환삼덩굴 추출액 처리에 의해 생산된 수정란의 질적 분석을 수행하였음. 그 결과 체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액의 처리(0.01 $\mu\text{g/ml}$)는 정자의 운동성보다는 ROS 발생에 있어서는 유의적으로 감소함(그림 3; $p < 0.05$). 한편, 체외수정 시 환삼덩굴 추출액 처리에 의해 생산된 배반포의 질적 수준을 평가한 결과, 환삼덩굴(0.01 $\mu\text{g/ml}$) 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포 수는 증가하였고, 세포사멸지수는 유의적으로 감소하는 것을 확인하였음(그림 4). 따라서 본 연구 결과들은 한우 체외수정란 생산 과정에서 천연물질인 환삼덩굴 추출액의 처리로 인해 체외수정 후 배반포로의 발달효율과 세포사멸을 감소 시킴으로써 궁극적으로 배반포의 질적 수준을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였음.

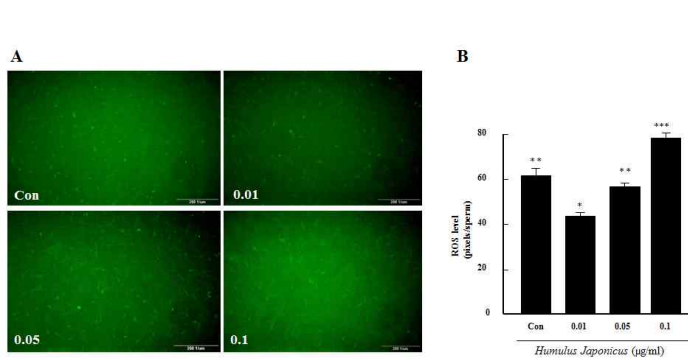


그림 3. 소 정자에서의 ROS 발현 이미지. (A) 세포 내 ROS 형광 발현 이미지, (B) ROS 발현 수준 정량화($p < 0.05$).

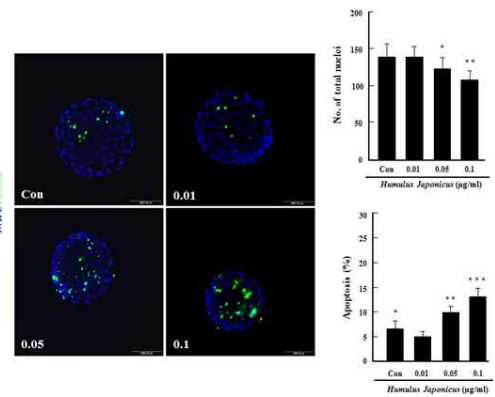


그림 4. 환삼덩굴 추출액 농도에 따라 생산된 소 배반포에서 세포사멸 양상 이미지 및 질적 수준 정량 분석($p < 0.05$).

(3) 3차 년도

한우 체외수정란의 체외배양에서 황백과 환삼덩굴의 추출액 처리에 따른 배반포로의 발달 효율, 질적수준 향상, ROS 제거 능력 검증 및 세포사멸에 있어서 효과 검증

① 체외배양 시 한우 수정란의 배발달에 있어서 황백 추출액 처리에 따른 배반포 발달 효율 관찰 : 한우 체외수정란의 체외배양과정에서 황백 추출액을 농도(0.01, 0.05, 0.1 $\mu\text{g/ml}$)에 따라 수정이후부터 배반포로의 발달기간 동안 7일간 처리하여 배반포 발달율을 조사하였음(표 2). 황백 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 처리군에서 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발달율은 대조군보다 높게 나타났음. 그러나 0.05 또는 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 황백 추출액 처리군에서는 배반포의 발달 효율은 오히려 대조군보다 유의적으로 감소함을 확인하였음(표2, $p < 0.05$). 이러한 결과를 바탕으로 체외 배양 실험에 대한 황백 추출액의 적정 농도를 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 로 설정하였음. 또한, 배반포 발달 효율에 있어서 황백 추출액의 첨가는 배반포로의 발달율 향상에 있어서 긍정적이 효과를 제시하였음.

표 2. 한우 체외수정란의 체외발달과정에서 황백 추출액 처리에 따른 난할율 및 배반포로의 발달율

Group ($\mu\text{g/ml}$)	No. of embryos examined	No. (%) of embryos cleaved	No. (%) of blastocysts produced
0	36	30 (89.4 \pm 6.2)	9 (25.0 \pm 0.0) ^a
0.01	36	31 (85.6 \pm 6.2)	11 (30.6 \pm 0.9) ^b
0.05	36	32 (88.8 \pm 1.8)	6 (16.3 \pm 5.3) ^c
0.1	36	28 (83.8 \pm 5.3)	5 (13.8 \pm 1.8) ^c

($p < 0.05$)

② 체외배양 시 한우 수정란의 배반포로의 발달과정에서 황백과 환삼덩굴 추출액의 병행 처리 효과 확인

체외수정 후 한우 수정란의 체외배양 배양액에 환삼덩굴 (0.01 $\mu\text{g/ml}$)과 황백 추출액 (0.01 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하여 배반포까지의 발달 효율을 조사하였음. 또한, 한우 수정란의 배발달에서 배반포 생산효율에 긍정적인 효과가 있다고 알려진 melatonin을 이용하여 천연물질 처리군과 물질을 처리하지 않은 대조군으로 나누어 비교 분석하였음. 그 결과, 수정 후 한우수정란의 난할율은 대조군과 차이가 없었지만, 배반포로의 발생 효율은 환삼덩굴과 황백 각각 처리한 군들이 대조군에 비해 증가함을 확인하였음(표3; $p < 0.05$). 특히, 환삼덩굴과 황백을 병행 처리한 군에서 배반포로의 발달 효율이 유의적으로 높아졌으며 (표3; $p < 0.05$) 항산화적 효과를 가지고 있는 멜라토닌 처리군과 유사한 결과를 확인할 수 있었음. 이러한 결과들을 통하여 한우 체외수정란의 배반포로의 발달과정에서 황백과 환삼덩굴 추출액이 강력한 항산화제로서의 효능을 지닌 것으로 제시되었음.

표 3. 한우수정란의 체외 발달과정에서 난할율 및 배반포로의 발달율에서 환삼덩굴과 황백 추출액병행처리 효과 확인

<i>Phellodendron</i> <i>Amurense</i> Bark ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Humulus</i> <i>Japonicus</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Melatonin (μM)	No. of embryos examined	No. (%) of embryos Cleaved	No. (%) of blastocysts produced
0	0	0	194	161 (82.6 \pm 9.0)	49 (25.4 \pm 1.6) ^a
0.01	0	0	101	90 (88.9 \pm 6.9)	31 (30.9 \pm 1.5) ^b
0	0.01	0	119	102 (86.6 \pm 5.3)	34 (28.9 \pm 2.9) ^b
0.01	0.01	0	126	110 (87.4 \pm 2.6)	44 (34.8 \pm 2.1) ^c
0	0	0.1	114	94 (84.2 \pm 7.4)	41 (35.7 \pm 5.1) ^c

($p < 0.05$)

③ 한우 체외수정란의 체외배양에서 황백과 환삼덩굴 추출액 병행 처리에 의한 배반포의 질적 수준 분석 및 세포사멸에 있어서 효과 검증

한우수정란의 체외수정 후 체외배양과정 동안 환삼덩굴(0.01 $\mu\text{g/ml}$)과 황백(0.01 $\mu\text{g/ml}$) 추출액을 각각 또는 병행 처리한 군으로부터 생성된 배반포의 총 세포 수와 세포사멸지수를 TUNEL assay 분석을 통하여 조사하였음(그림 5). 그 결과, 환삼덩굴과 황백 추출액을 각

각 처리한 군에서 배반포의 총 세포수의 변화는 없었지만, 세포사멸지수에서 대조군 보다 유의적으로 감소한 것을 확인하였음($p < 0.05$). 또한, 환삼덩굴과 황백 추출액을 병행 처리한 군에서 발달된 배반포의 총 세포 수는 대조군과 각각 처리한 군에서 보다 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 세포사멸지수는 가장 많이 감소한다는 것을 확인하였음($p < 0.05$). 특히, 황백과 환삼덩굴추출액을 함께 처리한 군에서는 항산화제로 알려진 멜라토닌처리군의 결과와 유사함을 확인하였음(표 4). 뿐만 아니라, 한우 수정란의 체외배양 시 환삼덩굴과 황백 추출액 처리에 의해 생산된 배반포의 질적 수준 분석 및 세포사멸에 있어서 효과 검증을 확인하고자 대표적인 세포사멸 유전자인 caspase 3 유전자의 면역형광 분석을 통하여 발현 양상을 조사하였음. 그 결과, 황백과 환삼덩굴 추출액을 병행 처리한 군에서 발달된 배반포에서 cleaved caspase3의 형광발현이 대조군에 비해서 유의적으로 감소한다는 것을 확인하였음. 특히, 세포사멸감소의 효과에 대한 또 다른 대조군으로 항산화제 및 세포사멸저해효과가 있다고 알려진 melatonin($0.1\mu\text{M}$)을 처리하여 비교 분석함으로써 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 세포사멸 감소 효과를 검증하였음(그림 6). 이와 같은 결과들을 통해서 한우 체외수정란의 체외배양에서 황백과 환삼덩굴 추출액의 첨가는 생산된배반포의 질적 수준 향상에 있어서 긍정적인 효과가 있음을 제시함.

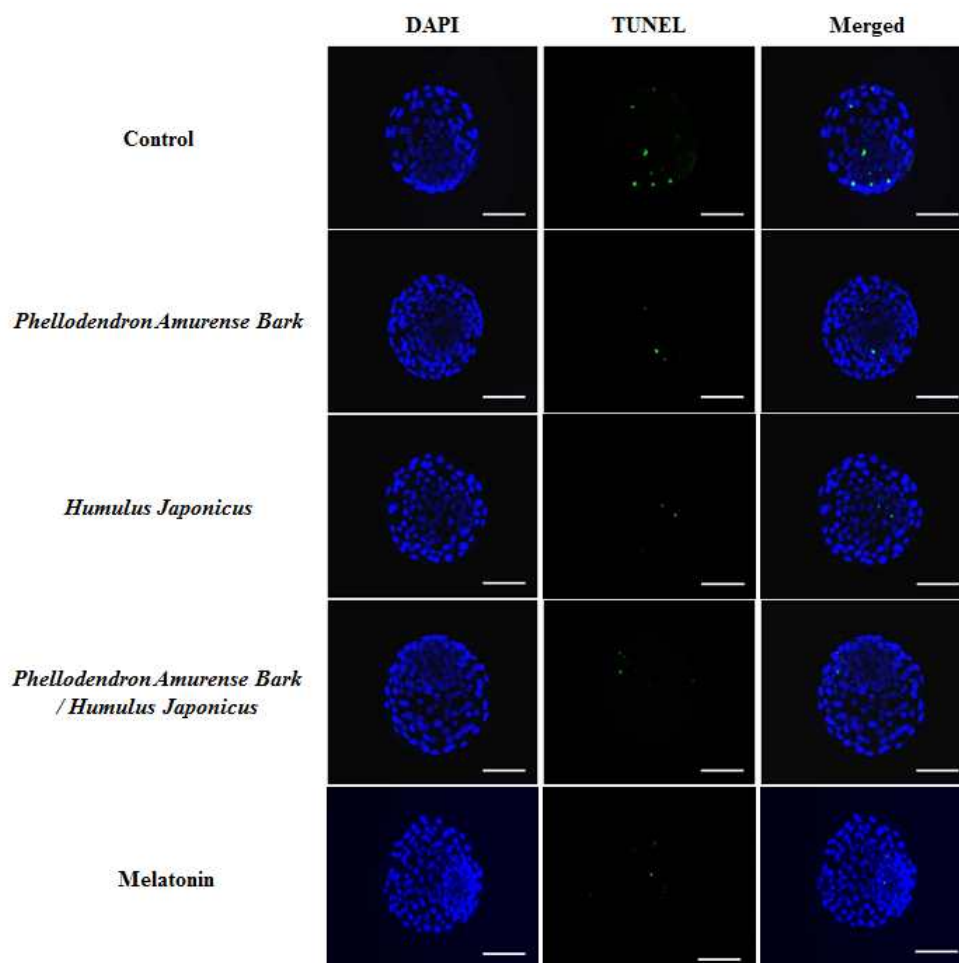


그림 5. 한우 체외수정란의 체외배양에서 황백과 환삼덩굴의 추출액 처리 후 생성된 배반포에서 세포사멸 양상 확인

표 4. 소 체외수정란 배양과정에서의 환삼덩굴과 황백 추출액 처리 후 생성된 배반포에서 세포사멸 양상

<i>Phellodendron Amurense</i> Bark (µg/ml)	<i>Humulus Japonicus</i> (µg/ml)	Melatonin (µM)	No. of blastocysts	No. of cells		TUNEL-positive Cells (%)
				Total	TUNEL-positive	
0	0	0	20	112.5 ± 14.8 ^a	4.9 ± 1.1 ^a	4.4 ± 1.0 ^a
0.01	0	0	15	117.7 ± 14.9 ^a	3.4 ± 1.0 ^b	2.9 ± 0.7 ^b
0	0.01	0	16	114.8 ± 11.7 ^a	3.6 ± 1.2 ^b	3.1 ± 1.1 ^b
0.01	0.01	0	19	141.2 ± 15.8 ^b	2.0 ± 0.8 ^c	1.4 ± 0.6 ^c
0	0	0.1	14	135.9 ± 15.7 ^b	1.8 ± 0.9 ^c	1.3 ± 0.7 ^c

(p<0.05)

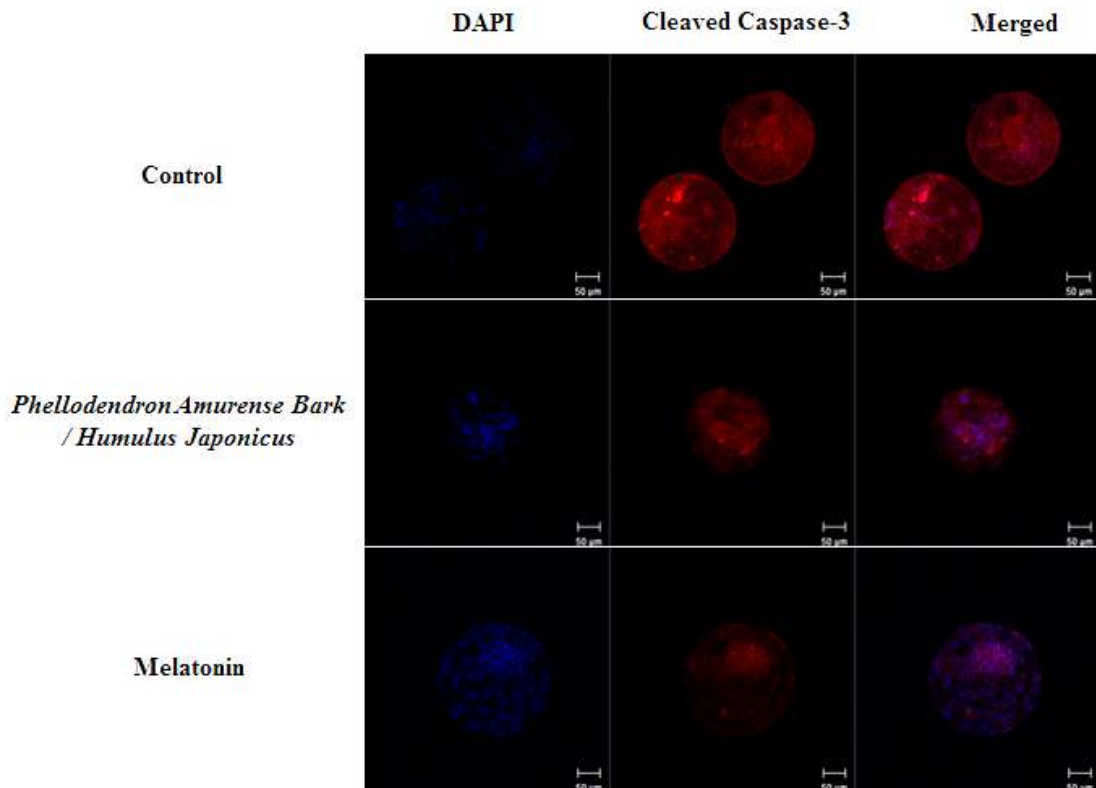


그림 6. 한우 체외수정란의 체외배양에서 황백과 환삼덩굴의 추출액 병행 처리 후 생성된 배반포에서 세포사멸 유전자인 caspase 3의 발현 양상 확인

④ 체외배양 시 한우 수정란의 배반포로의 발달과정에서 황백과 환삼덩굴 추출액의 처리에 따른 ROS 제거효과 확인

체외배양 시 환삼덩굴(0.01 µg/ml)과 황백(0.01 µg/ml) 추출액 처리로 생성된 배반포를 이용하여 ROS 생성을 조사하기 위해 DCFDA를 이용하였음. ROS 생성 수준을 측정된 결과, 환삼덩굴과 황백 추출액을 각각 첨가한 처리군보다 병행 처리한 군에서 발달한 배반포에서

ROS 생성이 대조군과 비교하였을 때 유의적으로 감소한다는 것을 확인하였음($p < 0.05$). 또한, 환삼덩굴과 황백 추출액을 병행 처리하였을 때 생성된 배반포에서 ROS의 생성은 항산화제인 melatonin 처리군과 유사하게 나타남을 알 수 있었음(그림 7). 이러한 결과들은 천연물질인 환삼덩굴과 황백 추출물이 항산화제로 알려진 멜라토닌과 동일한 효과를 가지므로써 배반포 이후의 발생에 긍정적인 효과를 제시하였음. 또한, ROS의 생성 감소를 통하여 생성된 배반포에서 세포사멸지수를 감소시키고 궁극적으로 배반포의 질적 수준을 향상시킨다고 판단됨.

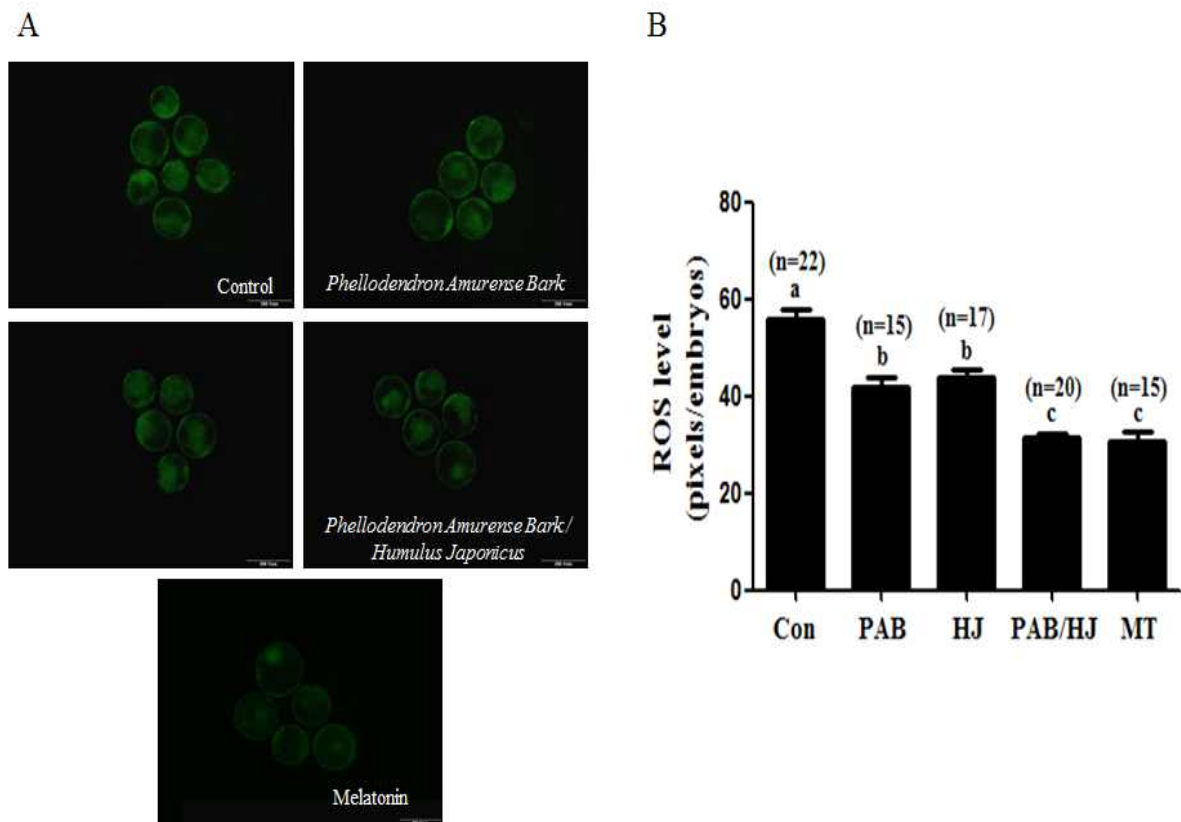


그림 7. 체외배양 시 한우 수정란의 배반포로의 발달과정에서 환삼덩굴과 황백 추출액 처리 후 생성된 배반포에서 ROS의 양상

위 결과를 종합하면, 한우 수정란의 체외발달과정 동안 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 첨가는 배반포로의 발달 효율 및 생산된 배반포의 질적 수준의 향상시킨다는 것을 확인하였고, ROS 제거 능력을 통한 항산화적 효과를 통하여 배반포의 세포사멸수준을 감소시킨다는 사실을 검증하였음. 따라서 천연물질 황백과 환삼덩굴 처리는 한우 체외수정란의 체외배양에서 난할율, 배반포로의 발달효율, 질적수준 향상, ROS 제거 능력 검증 및 세포사멸지수 감소에 있어서 긍정적인 효과를 제시함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	한우 자궁 내 미생물환경 분석 및 천연물질 검토	100	각 개체별 미생물 환경 분석 자궁회복기간의 미생물 환경변화 분석 자궁 내 분리 및 동정된 균에 대한 황백 및 환삼덩굴 추출물의 효과 분석
	한우 자궁 내 미생물의 분류 및 유해성 여부 분석	100	한우 자궁 내 균의 분류, 동정 및 유해성 여부 분석 한우 저수태우로부터 회수된 균 분포 조사 항생제 테스트 후, 자궁 환경 개선을 위한 천연후보물질 (황백 및 환삼덩굴 외) 제안
	배반포 발육 및 세포 사멸관련 유전자의 발현 양상 분석	100	세포사멸 억제제(E-64)을 이용하여 한우 체외수정란 생 산 과정에서 처리한 결과, 한우 체외 배반포 생산 효율 성 증대와 동결/융해 후 생존력 향상을 확인하였음. 또 한, 생산된 배반포를 이용하여 세포사멸 양상을 염색과 유전자 분석을 통해 확인한 결과, 전체세포수는 E-46 처 리군에서 증가하였고, 세포사멸지수는 감소하였음. 세포 사멸관련 pro-apoptotic 유전자인 Bax의 발현은 감소하 였고, anti-apoptotic 유전자인 Bcl-xL은 증가하는 양상 을 보여 주었음. 결론적으로 한우 체세포 배양 과정동안 세포사멸 억제제인 E-64의 처리로 한우 체외수정란의 발달능력과 질적 수준을 향상시킬 수 있었음.
	자궁 내막세포에서 임신 관련 유전자의 발현 양상 분석	100	정상 난소와 비정상 난소를 가진 한우 자궁에서 자궁내 막세포를 추출하여 세포사멸과 착상 관련 단백질들의 발 현을 비교 분석한 결과, 정상 난소를 가진 자궁내막세포 에서 세포사멸이 억제되고 착상 관련 단백질인 E-cadherin의 발현이 증가 하는 것을 확인하였음. 결론 적으로 비정상 난소를 가진 자궁내막세포는 세포사멸이 증가하고 착상에 문제가 있어서 정상적인 임신을 유도하 는 데 있어서 문제가 될 것으로 판단됨.
2차 년도 (2014)	정상번식우, 저수태우로부터 자궁 내 미생물 채취	100	미경산우 6두, 정상번식우 13두, 저수태우 8두로부터 자 궁 내 미생물을 채취하여 분석에 이용 정상번식우 9두 및 저수태우 10두로부터 발정주기 내 18일간 혈액을 채취하여 혈중 estrogen, progesterone 분 석을 실시하여 비교

			정상변식우 4두와 저수태우 4두의 난소, 자궁경관 및 자궁 내 초음파분석을 실시하여 생식기도관 내 비교
	자궁 내 미생물 동정 및 후보천연물질의 항균능력 검사	100	미경산 한우, 정상변식 한우, 변식장애 한우, 한우 정액에서 미생물 분리 및 동정(14개의 균 분리) 선별된 다섯가지 후보천연물질의 항균능력 검사 결과, 환삼덩굴과 황백이 우수한 항균능력을 보임
	자궁내막염 및 다양한 염증 반응에서 천연물질의 효과	100	마우스 <i>IN VIVO</i> 실험을 통해 질내 LPS를 투여하여 특이적 반응 확인 마우스 <i>IN VIVO</i> 실험을 통해 질내 HCL를 전투여한 후 LPS를 투여하니 염증단백질 발현 변화를 보여 현재 환삼덩굴과 황백으로 <i>IN VIVO</i> 실험결과 도출
	천연물질이 한우 생식세포의 번식생리에 미치는 영향 분석	100	체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액을 처리한 결과, 정자의 운동성에는 각각의 처리군이 대조군과 비슷하였지만, ROS 발생에 있어서는 환삼덩굴 처리군이 대조군보다 유의하게 낮게 나타났다. 한편, 수정 양상은 유사한 양상을 보였음. 체외수정 배지에 환삼덩굴 추출액 처리후 배반포로의 발달율을 조사한 결과, 처리군에서의 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발달율은 대조군보다 유의하게 높게 나타남을 확인할 수 있었음. 또한, 황백 처리군에 있어서도 유사한 결과를 확인할 수 있었음.
	한우 체외수정란의 효율적 생산에 관한 지속적 접근	100	체외수정 시 환삼덩굴 추출액 처리에 의해 생산된 배반포의 질적 수준을 평가한 결과, 환삼덩굴 추출액 처리군에서 생산된 배반포의 총 세포 수는 증가하였고, 세포사멸지수는 감소하는 경향을 확인할 수 있었음. 또한, 황백 처리군에 있어서도 유사한 결과를 확인할 수 있었음.
3차 년도 (2015)	자궁 내 균이 생식세포에 미치는 영향 분석	100	균은 자궁 내 분리균 26종, 정액 내 분리균 11종을 이용하였으며 상실배 단계의 수정란과의 공배양을 통해 균이 생식세포에 미치는 영향을 검토함
	황백 및 환삼덩굴 추출물의 유효성분 분석	100	황백의 경우에는 이미 많은 분석연구와 성분에 대한 정보가 논문으로 알려져 있으며, 실제 분석결과에서도 이미 알려진 내용과 동일하게 알칼로이드 성분인 berberine, palmatine이 가장 많은 면적값을 보이고 있는 것을 확인함. 환삼덩굴의 경우에는 다양한 조건에서 측정을 하여 비교를 하였지만 황백의 경우처럼 주성분으로

		불릴만한 것을 구분하지 못함.
황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입 방법 고안	100	황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입을 위하여 우선적으로 희석방법과 대용량을 손쉽게 제조할 수 있는 방법을 고안하고자 하였으며 DMSO에 용해 시, 100 ml 이상 단위의 대용량 제조 시에는 추출물의 용해율이 떨어져 손실되는 부분이 다량 발생함. 따라서 DMSO의 대안으로써 Medium Chain Triglycerides(MCT) oil을 사용함
황백 및 환삼덩굴 추출물의 자궁 내 주입이 수태율에 미치는 영향 검토	100	실험에 이용된 황백과 환삼덩굴 추출물을 1:1로 용해시킨 100% 원액을 각 100, 1000, 10000배로 희석하여 자궁 내 주입 실험을 실시. 추출물에 의한 인공수정 및 수정란 이식 수태율 조사
저수태우 자궁 내 후보천연물질 투여 후 미생물의 동정 및 후보천연물질 투여 전의 자궁 내 미생물과 비교	100	실험에 이용된 황백과 환삼덩굴 추출물을 1:1로 용해시킨 100% 원액을 각 100, 1000, 10000배로 희석하여 자궁 내 주입 실험을 실시. 추출물에 의한 자궁 내 균 변화 분석.
LPS를 질내 투여 방법을 통한 마우스의 항염증 효과 분석	100	조직학적 스코어를 통해 HCl을 먼저 자궁내 투여후 LPS를 자궁내 4회 투여하는 경우가 자궁내 염증을 더 유발하는 것으로 나타났으며 이 결과는 기존의 LPS를 자궁내 또는 복강내 투여하는 경우보다 HCl을 전투여 한 후 LPS를 자궁내 투여하는 경우가 자궁 염증 모델로써 적합하다는 것을 알려줌
천연물질을 통한 <i>In vivo</i> 실험시 마우스의 항염증 효과 분석	100	HCl을 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하여 임상적 소견을 스코어하였을 때 염증정도가 11정도를 나타냈지만 황백(PC-PID)과 환삼덩굴(HJ-PID)를 전투여 하였을 경우 염증스코어가 5에서 6 또는 2에서 4정도로 감소하는 것으로 나타남
번식장애우의 염증성 사이토카인 분비 차이 분석, 자궁세척액으로부터 사이토카인 ELISA kit을 이용한 조성 검사	100	HCl을 투여 후 2시간 간격으로 4회 LPS를 투여하면 자궁 내 염증 유도 단백질 IL-1 β 와 TNF-a의 발현이 유도되는 것을 확인하였으며 황백과 환삼덩굴을 전 처리 하였을 경우 IL-1 β 와 TNF-a의 발현이 감소하는 것으로 나타남.
한우 수정란의 체외 배양에 있어서 천연물질들의 첨가 효과 분석	100	체외배양 시 환삼덩굴과 황백 추출액을 각각 처리한 결과, 처리군에서의 난할율은 대조군과 비슷하였지만, 배반포로의 발달율은 대조군보다 유의하게 높게 나타남을 확인하였다. 또한 환삼덩굴과 황백을 함께 처리하였을 때에는 항산화제로 알려진 멜라토닌과 유사한 결과를 볼 수 있었음.
한우 수정란의 체외	100	체외배양 시 환삼덩굴과 황백 추출액을 처리한 뒤 세포

	배양에 있어서 천연물질들의 첨가에 의한 ROS 제거 능력 분석		사멸지수와 세포사멸 유전자의 발현이 감소함으로써 배반포의 질적 수준이 향상됨을 확인하였고, ROS의 생성이 감소하는 것을 대조군과 비교 분석하여 확인하였음. 또한, 환삼덩굴과 황백 추출액을 함께 처리하였을 때, ROS 생성수준 및 세포사멸 지수가 가장 유의적으로 감소하였으며, 이는 항산화제인 멜라토닌 처리와 비슷한 효과를 확인하였음.
	천연물질 처리에 의한 한우 배반포로의 지속적 생산	100	한우 수정란의 체외발달과정 동안 천연물질인 황백과 환삼덩굴의 첨가는 배반포로의 발달 효율, 한우 수정란의 난할율 및 생산된 배반포의 질적 수준의 향상시킨다는 것을 확인하였음. 따라서 황백과 환삼덩굴 추출액의 처리는 한우 수정란의 난 분할율 증가와 배반포로의 발달 효율을 지속적으로 향상시키는데 있어서 긍정적인 효과를 보여줌.

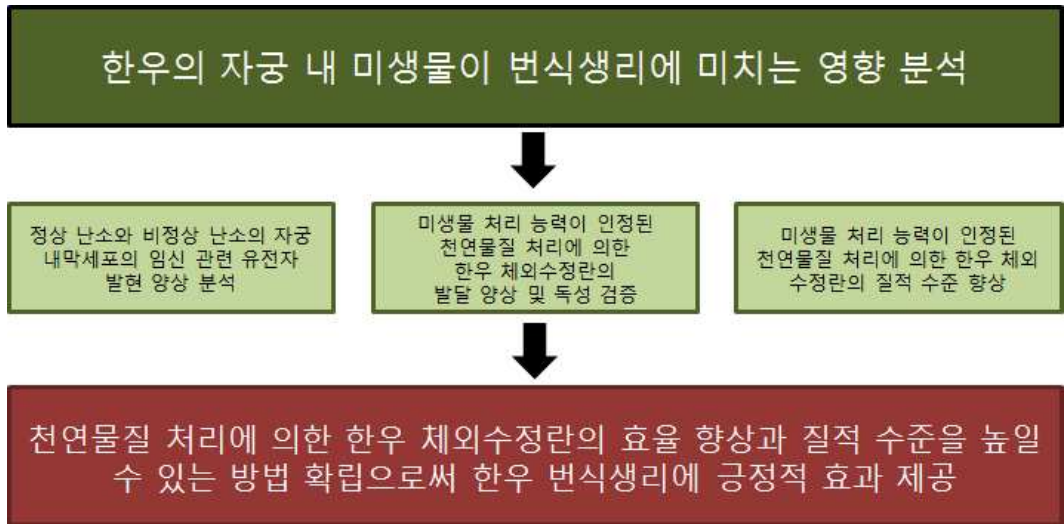
제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

본 연구과제는 자궁 내 미생물로 인한 수태율 감소와 생식기관 질병을 극복하고자 천연항생물질을 이용하여 항생제 사용에 따른 부작용을 방지하고 자궁 환경개선제를 개발하여 자궁 균을 제거함으로써 자궁 내 미세환경 개선에 의한 한우의 수태율 향상이 한우농가에서의 생산비 절감과 현장에서 실용화 될 수 있는 모델을 개발하여 농가가 갖고 있는 문제점 해결을 기대한다.

한편 본 연구과제에 대한 평가기준은 한우의 자궁 미세환경 개선을 위해 생식관련 세포(자궁세포, 수정란, 정자)차원에서의 환경연구, 자궁 내 균의 연구 그리고 한우의 발정, 번식 및 분만과정에서 자궁 환경과 관련된 요인 분석 등 자궁환경 개선을 위한 3가지 관점에서의 연구를 수행함으로써 표면적으로 나타나는 한우 수태율 향상 뿐만 아니라 자궁 내 균이 환경에 미치는 영향과 그 원인을 분석하고 해결할 수 있는 방안을 모색함으로써 한우농가의 경제적 이익 증대에 기여할 것으로 판단된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과



제 2 절 성과활용 계획



1. 안전축산물

소비자들의 요구와 맞물려 무항생제, 유기축산, 친환경축산, HACCP 등의 제도가 권장되고 있는 현실임

본 연구는 인체 및 가축에도 무해한 한방요법을 활용함으로써 황백, 환삼덩굴을 이용하여 안전성이 확보된 항생제 대체물질을 개발하고 현장에 적용하고자 한다.

2. 젖소 무항생제 인증

자궁세척을 통하여 수태율 증진, 제4위 전위예방 등 산과질병을 예방할 수 있으나, 현재까지 생산된 자궁세척제, 자궁내막염 치료제는 항생제를 이용한 것으로 원유의 무항생제 인증 또는 잔류 항생물질과 같은 납유에 부정적인 영향을 가져옴으로써 농가소득을 저하시킴

본 연구의 제제는 무항생제의 한방제제 등을 활용하여 위와 같은 문제를 해결하고 낙농가의 소득증대에 기여하고자 함

3. 수정란 이식 수태율 증진

국내 평균적인 수태율이 50% 이상 상회하지 못하는 이유 중 하나로 현재까지 자궁 내 무균이라는 개념으로 이식이 실시되었으나, 본 연구결과와 같이 자궁 내에는 다양한 미생물이 있는 것으로 확인이 됨

미생물의 영향으로 수태율이 상승되지 못하는 측면이 있을 것으로 생각되며, 본 연구에서 개발될 제품으로 수태율이 증진된 결과를 토대로 번식농가의 수태율 향상을 기대함

4. 저렴한 수태율 증진보조제 활용

본 제제를 제작한 후, 인공수정 또는 수정란 이식 2~3일 전에 자궁 내 주입을 실시하여 현재의 수태율(약 60% 또는 40%) 보다 약 10~15% 증진될 것으로 기대함

본 제제를 농가에서 쉽게 사용할 수 있도록 하여 기술이전 후 두당 5,000원 내외의 시장가격으로 누구나 부담없이 사용하는 제품으로 활용

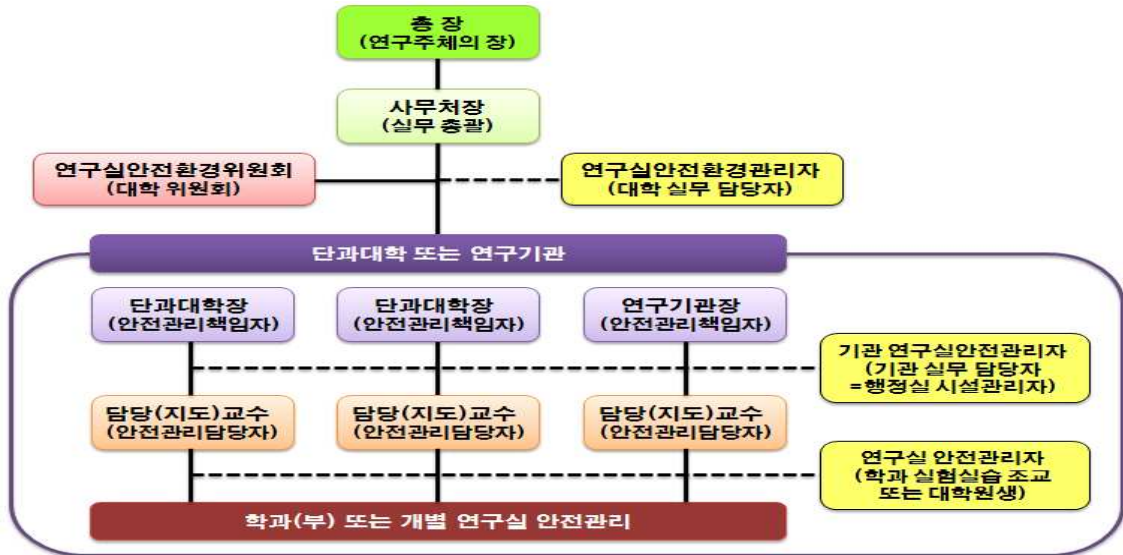
제 6 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 2015학년도 연구실 안전환경 관리 업무추진 일정

추진내용	추진일정(월)												비고			
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2				
연구실 안전환경 업무 추진계획 검토	■	■														
연구실 현황 조사	■	■						■	■							
연구실 안전환경 위원회			■	■												
연구활동종사자 안전교육			■	■					■	■						
연구실 정기점검 및 개선사항 조치			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
연구실 환경개선 사업 검토 및 시행			■	■					■	■						
연구활동종사자 건강검진								■	■							
상해보험가입												■	■			

작성방법) ■ : 계획검토 및 결과분석 기간, ■ : 업무추진 기간

2. 연구실 안전환경 업무 조직



3. 연구실 정기점검

가. 정기점검의 배경

『연구실 안전환경 조성에 관한 법률』 제8조(안전점검의 실시)에 정한 사항과 산업안전보건법 등 관련법을 준용하여 연구실의 위험요소를 파악하여 관리방안을 모색하고 개선한다면 안전한 연구실 환경이 조성할 수 있음.

나. 정기점검의 세부목적

- 1) 연구활동종사자들이 연구에 전념할 수 있도록 연구실에 잠재되어 있는 위험으로부터 사고를 방지하고 안전한 실험실을 조성하는데 기여

- 2) 연구실의 불안전한 상태 및 연구활동종사자들의 불안전한 행동을 파악하여 적절한 개선방안을 제안함으로써 건강과 안전의 확보
- 3) 쾌적한 실험실 환경구축의 기반조성 및 안전예산의 효율적 사용을 통한 대학 연구실 안전관리 활동의 질적 향상 도모

다. 정기점검 범위

구 분	점 검 범 위	비 고
연구실 일반 관리	<ul style="list-style-type: none"> • 안전관리 규정 및 실시평가서(체크리스트, 안전교육 실적) 작성 여부 • 정리정돈 상태, 통로 확보상태, 적재물 적치 상태 • 연구시설물 레이아웃 배치도 • 연구활동종사자 자세 불안전 행동 등 휴먼에러 요인 점검 • 안전 점검 및 정밀안전점검 지적사항에 대한 조치 사항 • 사고발생 보고 및 통계 • 연구실 준공도면, 시공·보수 도면 • 강제 균열 및 도장, 부식 상태 확인 	
산업위생 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실내 환경(조명, 소음 등) 상태 • 국소배기 환기 상태, 닥트시설, 챔버 작동 상태 • 일반 보호구의 비치 및 관리 상태 • 안면·호흡 보호 장비의 비치 및 관리 상태 • 냉장고내 음식물 반입 보관 • 폐기물 수집·보관·관리 상태 • 연구실내 공기질 및 유독 가스량 측정 	
전기 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 전기과부하, 접지, 정전기 제거 상태 • 전기배관 정리 및 피복(절연) 상태 • 전기스위치, 분전함 내 차단기 용량과 규격 등 전기안전사항 • 전기설비 계통도 	
소방 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 비상구 관리상태 및 출입문 표시 부착 상태 • 소화기 비치 여부 • 가연성 물질로 인한 화재 위험요소(점화원 등) 확인 • 화재감지기 및 소화설비의 적정성 	
화학약품 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 물질안전보건자료(MSDS) 비치 및 활용여부 • 화학물질의 정상별 분류 보관, 라벨, 배치상태, 혼재 여부 • 화공약품의 누설, 누수 여부 • 폐액 관리 상태(정상별 분류 및 폐액용기 표시 부착 여부) 	
가스 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 가스용기 보관 장소, 혼재여부 • 가스용기 고정 및 누설, 부식, 표지 상태 • 가스배관 설치의 적정성 및 누설, 부식 상태 • 가스누설경보장치, 안전밸브 등 안전설비의 설치 상태 	
기계 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 기계·기구 안전장치 작동 상태 및 안전장치 명세서 • 각종 시설의 안전 매뉴얼 • 제작 및 작업 도면, 각종 운반기자재 상태 • 배관 설비 계통도 	
생물 분야	<ul style="list-style-type: none"> • 바이러스, 세균 및 혈액 등의 안전 및 관리 상태 • 병원체 등 취급 시험연구시설의 안전운영 상태 	

4. 연구 활동 종사자 상해보험

가. 가입목적 : 교직원을 제외한 대부분의 연구 활동 종사자의 경우 안전사고 발생 시 제도적으로 재정적 보상을 받을 수 있는 장치가 없기 때문에 별도로 상해보험을 가입

- 나. 가입대상 : 연구 활동으로 안전사고 우려가 있는 대학생, 대학원생, 시간강사, 연구원, 실험실습조교 등
- 다. 관련 법률 : 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」
제14조(보험가입) 연구활동종사자의 상해, 사망에 대비하여 연구활동종사자를 피보험자 및 수익자로 하는 보험에 가입하여야 함
- 라. 보상 한도 : 사망 1억원 보상, 부상/질병 1,000만원 한도

5. 연구 활동 종사자 안전교육

가. 대상 및 시간

- 1) 정기 교육·훈련 : 반기별 6시간 이상
- 2) 신규채용 등에 따른 교육·훈련
 - 신규 채용 된 연구활동종사자 : 8시간 이상
 - 대학, 연구기관 등에 채용되진 않았지만 신규로 연구개발 활동에 참여하는 연구활동종사자 : 2시간 이상
- 3) 특별 안전교육·훈련
 - 중대 연구실사고 발생 및 연구내용 변경 등의 경우 연구주체의 장이 필요하다고 인정하는 연구활동종사자 : 2시간 이상

나. 교육 내용 : 연구(실험)실 내 연구활동 중 발생할 수 있는 위험요소의 확인 및 제거를 위한 실질적인 교육

다. 교육담당 : 연구실안전관리자(지도교수, 학과장 등)

라. 본부 주관 교육 : 연간 2회 이상(4월, 10월 중) “대구대학교 연구실 안전환경 관리 지침서”를 활용하여 집체 교육을 실시하고, 수시로 안내, 공지를 통하여 교육 시행

6. 연구 활동 종사자 건강검진

가. 목적 : 연구 활동 종사자의 건강수준 평가와 현재 건강상태 파악 및 지속적인 건강관리의 기초자료로 활용하기 위함

나. 대상

- 1) 인체에 치명적인 위험물질(예, 유해성 물질 사용자) 또는
 - 2) 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자
- ※ 단, 「국민건강보험법」, 「학교보건법」에 따른 신체검사를 받는 경우는 제외

다. 시행시기 : 신입생 및 신규 기숙사 입사생 신체검사 시기에 맞춰 시행

제 7 장 참고문헌

1. Bae HK, Yoon NS, Hwang IS, Park CK, Yang BK, Cheong HT. 2014. Effect of L-Glutathione Treatment during Somatic Cell Nuclear Transfer Procedures on the Subsequent Embryonic Development and DNA Methylation Status of Cloned Bovine Embryos. *J. Emb. Trans*, 29(4):345-350.
2. Lee SH, Park EJ, Moon JH, Kim SJ, Song KY, Lee BC. 2015. Sequential treatment with resveratrol-trox improves development of porcine embryos derived from parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 84(1):145-154.
3. Lee YH, Kim JW, Chae SK, Ahn JH, Do GY, Koo DB. 2015. Anti-Apoptotic Effects of Catalpol on Preimplantation Porcine Embryos. *J. Emb. Trans*, 30(1):23-31.
4. V. Sapanidou, I. Taitzoglou, I. Tsakmakidis, I. Kourtzelis, D. Fletouris, A. Theodoridis, I. Zervos, M. Tsantarliotou. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 84(8):1273-1282.
5. Zullo G, Albero G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. 2015. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, In Press
6. T KARAŞAHİN, Ş ARIKAN. 2015. The effect of oleic and linoleic acids on in vitro bovine embryonic development and embryo quality. *Turk J Vet Anim Sci*, 39:154-159.
7. Ibrahim A.H. Barakat, Ahmad R. Al-Himaidi and Ahmed M. Rady. 2014. Antioxidant effect of Green Tea Leaves extract on in vitro production of sheep embryos. *Pakistan J. Zool.*, vol. 46(1). pp. 167-175.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.