최 종
연구보고서

돼지의 지방생합성 조절을 위한 면역학적 및 생화학적 접근

Immunological and Biochemical Approach for the Regulation of Fat Biosynthesis and Accumulation in Swine

건 국 대 학 교

농 림 부

편집순서 2

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지의 지방생합성 조절을 위한 면역학적 및 생화학적 접근” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월 15일

주관연구기관명:건국대학교
총괄연구책임자 : 고태송
세부연구책임자 : 이훈택
세부연구책임자 : 이창수
연 구 원 : 장병준
연 구 원 : 조진국
연 구 원 : 김영범
연 구 원 : 한면수

요 약 문

Ⅰ. 제 목

돼지의 지방생합성 조절을 위한 면역학적 및 생화학적 접근

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

목적

돼지의 지방축적량을 감소시키는 항돼지지방세포막단백질 계란항체(IgY)를 개발하고 이의 이용방법을 조사한다.

중요성

1. 돼지의 체내에 지방이 과다한 축적은 에너지 대사에 영향을 미치므로 사료효율(증체/사료)을 감소시키고 돼지고기의 품질에 영향을 미친다. 따라서 돼지에서 지방축적이 적어지는 제제(사료)개발은 양돈업의 생산성을 향상시킨다.
2. 돼지고기중 지방함량이 적은 기능성 돈육 또는 다른 축산식품의 개발에 이용 가능
3. 채란양계업의 부가가치를 향상시킨다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

<모델 실험>

1. 3T3L-1세포의 막단백질에 대한 난황면역글로뷸린 (IgY)의 생산과 지방세포의 분화조절작용

본연구는 계란항체를 생산하는 모델과 이를 이용하여 지방세포의 분화를 조절하기 위한 모델을 확립하기 위하여 수행되어졌다. 면역 : 산란계에 3T3L1 세포주의 막단백질과 Complete Freund's adjuvant(CFA)의 유성액으로 최초면역하고 Imcomplete Freund's adjuvant(IFA)의 유성액으로 2주간격으로 두 번 추가면역하였다.

(1)최초면역후 4주후부터 계란을 수집하여 분리 정제된 항3T3L1 세포주의 막단백질-계란항체(IgY)의 순도는 SRID법으로 측정되었으며 60-98%였다. ELISA법으로 평가된 항체(IgY)의 반응성은 3T3L1 세포주의 막단백질과 매우 높았다.

(2)2.5% Porcine serum 또는 10% FBS가 함유된 3T3L1세포의 분화유도배지에 항

3T3L1-IgY를 첨가하면, 3T3L1세포의 분화와 GPDH활성은 대조구에 비하여 유의하게 ($P > 0.05$) 감소하였다.

(3)마우스에 항3T3L1-IgY를 1주에 1회씩 3주간 피하에 주입하면, 암 마우스의 난소주위 지방조직량은 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다.

이러한 결과는 항3T3L1-IgY는 3T3L1세포의 분화 와 암마우스에서는 지방축적을 제어 가능성을 제시하였다. 포유류에서 조류의 계란항체(IgY)를 이용하여 지방축적을 제어할 가능성을 제시하였다.

<지방생합성 억제 확인>

2. 돼지 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 계란항체 (IgY)의 작용

목적: 본 연구는 양돈생산성 향상을 위한 지방조직축적의 조절을 위해 IgY을 사용함에 있어서 조직특이성이 있는 IgY의 생산가능성조사하기 위하여 실시되었다.

방법 : 항-돼지지방세포 전구세포, 지방세포 막단백질 및 분화된 지방세포 용해물-계란항체 (IgY)가 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 작용을 조사하였다. 대조로서 지방세포 전구세포의 분화를 촉진하는 포도당 (Glucose), 리놀산 (Linoleic acid:C18:2)과 억제하는 비타민A (Retinoic acid : RA), Tumor necrosis factor (TNF)-α 및 Norepinephrine (NE)이 지방세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 물질들이 함유된 분화배지에서 분화한 지방세포 전구세포를 항원으로 채란계에 각각 면역시켜 생산된 항체(Glucose-IgY, C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY, NE-IgY)가 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 지방세포 전구세포의 분화는 분화세포수와 GPDH의 활성으로 판단하였다. IgY의 항원에 대한 반응성과 특이성은 ELISA, 전기영동, Immunoblot 및 Immunohistochemistry으로 조사하였다.

결과

(1) 항지방세포 전구세포-IgY 및 항혈청 (serum)은 대조에 비해서 16배 높은 반응을 보였으나, 피하, 복부 및 신장주위지방조직 유래 항-전구세포-IgY 사이에 유의차는 없었다. 항원주입 후 시간이 경과에 따라 IgY의 반응성이 높아졌다. 항지방세포 전구세포 막단백질-IgY의 반응성 2048배의 회석배율은 항-지방세포 전구세포-IgY에 비하여 크게 향상되었다.

(2) 분화배지중의 포도당 (glucose)과 리놀산 (C18:2)은 전구세포의 분화세포수를 증가시켰으나, GPDH 활성에는 유의한 영향이 없었고, 비타민 A (RA), TNF-α 및 NE는 분화세포수를 유의하게 감소시켰으며, GPDH 활성은 RA에 의해 유의한 영향은 없었으나, TNF-α와 NE는 유의하게 감소시켰다.

(3) 항분화세포 용해물-IgY인, Glucose-IgY, C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY 및 NE-IgY의 반응성은 512희석배율로 서로 비슷하였다.

(4) 분화배지중의 Glucose-IgY는 분화세포수를 높이는 경향이 있었으나 C18:2-IgY,

RA-IgY, TNF-α-IgY 및 NE-IgY는 분화세포수와 GPDH 활성을 감소시켰다.

(5)면역형광사진으로 평가한 반응성은 항분화 세포-IgY는 지방세포 전구세포와 강하게 반응하였으나, 간장조직, 비장조직 및 신장조직과의 반응성은 매우 약하였다.

(6)상기결과는 항지방세포막단백질-IgY는 돼지지방세포전구세포의 분화를 억제하며, 분화된 세포용해물(단백질)을 항원으로 한 IgY는 지방조직특이성을 높여서 지방조직에만 특이적으로 반응하는 IgY가 생산된 가능성이 있다는 것을 시사하였다.

<산업적 이용>

3. 돼지지방세포 전구세포의 분화에 미치는 항-항-돼지 지방세포 막단백질 토끼 IgG-IgY의 작용

목적 : 생산된 IgY가 포유류에서도 작용할가능성이 평가되었고, 항지방세포막단백질-IgY는 돼지의 지방세포전구세포의 분화를 억제한다. 항체의 산업적생산을 위한 항원의 생산 가능성과 최소량의 항원을 이용한 IgY의 생산실험을 실시하였다.

방법 : 돼지의 지방조직 축적을 조절하기 위하여 항-지방세포 막 단백질 계란항체(IgY)와 항-항-지방세포 막단백질 토끼혈청(IgG)-IgY (Idiotype IgY)가 지방세포의 분화에 미치는 작용을 조사하였다. 항돼지 지방세포 막단백질 토끼-혈청(IgG)를 10 ug 및 50 ug으로 각각 생산된 IgY (Idiotype IgY) 및 대조의 항-돼지 지방세포 막단백질 IgY을 각각 분리 정제하여 ELISA법으로 친화성을 조사하였다.

약 25 kg 돼지 (랜드레이스)의 복부와 등부위 피하 지방조직을 콜라젠분해효소 1mg/mL와 함께 배양하여 분리한 지방세포 전구세포를 배양배지에서 배양하고 시험배지와 여기에 10 ug/mL의 인슐린이 함유된 분화배지에서 배양하였다. 분화배지에 농도를 달리한 포도당, TNF-α 그리고 IgG, IgY, idiotype IgY가 함유되었을 때의 지방세포 전구세포의 분화정도를 시험배지 및 분화배지에서의 분화상황과 비교하였다. 분화는 GPDH활성과 분화된 세포에 축적된 중성지방의 Oil Red O염색으로 조사하였다.

결과

(1)항-돼지 지방세포 막단백질 IgY의 친화성은 최초 면역 후 첫번째 추가면역 4주까지는 뚜렷이 높아지지 않았으나, 그후는 시간의 경과와 함께 증가하였다. 두 번째 추가면역 후 8주의 친화성은 312 ng의 IgY까지 민감해졌으나 그 후 12주까지 더 높아지지 않았다.]

(2)IgG(정제한 토끼혈청) 10 ug으로 생산된항-항-지방세포 막단백질 토끼혈청(IgG)-IgY(idiotype IgY)의 친화성은 50 ug의 IgG로 작제된 것과 동일하였다. 최초 면역 2주 후부터 idiotype IgY의 친화성은 주령의 경과에 따라 높아져서 12 주의 친화성은 2.0 ng Idiotype IgY까지 민감해졌다.

(3)복부와 등 부위 피하 지방 유래 지방세포 전구세포는 시험배지에 비해 분화배지에서 배양하면 GPDH 활성이 유의하게 (P< 0.05) 높았고 Oil Red O의 붉은 염색상이 진해졌다. 분화배지에 TNF-α, IgY 및 Idiotype IgY를 첨가하여 배양된 전구세포의 GPDH 활성은 유의하게 (P<0.05) 낮아졌고 Oil Red O의 붉은 염색상이 묽어졌다. 분화배지의 포도당 농도가 20 mM로 높아짐에 따라 GPDH 활성은 증가하고 Oil Red O 염색은 진해졌으나, 분화배지중 TNF-α, IgG, IgY 및 Idiotype IgY의 농도가 높아짐에 GPDH 활성은 낮아지고, Oil Red O의 붉은 염색상은 묽어졌다 (P<0.05).

(4) 이상과 같이 항지방세포 막 단백질 토끼 IgG에 대한 계란항체 (Idiotype IgY)가 10ug의 IgG로 생산되어도 항지방세포 막단백질-계란항체 (IgY)또는 TNF-α의 작용과 비슷하게 돼지지방세포 전구세포에서 중성지방의 생합성과 축적을 낮추었다. 본연구는 지방세포 전구세포의 분화억제에 Idiotype-IgY의 사용이 가능하며 IgY의 생산을 위한 항원의 생산방법을 시사하고 있다.

4. 항돼지지방세포세포막단백질-IgY유래 Fab`조각의 기능

목적 : 항지방세포막-IgY의 작용메카니즘을 조사하고, 항체의 산업적이용을 위한 분자량이 낮은 IgY(Fab)를 생산하여 이의 이용성을 평가함에 있다.

방법 : 본 연구는 항돼지지방세포막단백질-IgY와 펩신(pepsin)을 배양하여 얻은 Fab` 조각의 특징과 이것이 돼지지방 전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

결과

(1) 전기영동상으로 확인한 펩신과 항돼지지방 막단백질-IgY의 비율(W/W)이 1:10과 1:25펩신 소화물은 59 kDa 부근에서 일정한 밴드가 나타났다.

(2) ELISA로 확인한 Fab`는 항원과 1,024배의 친화력을 보였고 이것은 IgY의 친화력과 같았다.

(3) 돼지지방세포막단백질의 전기영동상에 Fab`를 부착(Immunolot)하면 강한 친화력이 있었고 IgY의 Immunolot과 유사하였다.

(4)따라서 항돼지지방 막단백질-IgY의 펩신 소화물은 주로 59.4kDa의 Fab`가 생성된다는 것을 나타내었다.

(5)생산된 돼지지방 전구세포의 분화배지에 Fab`가 함유되면 지방세포전구세포의 증식(p<0.05)을 억제하였으며 증식세포수는 MTT의 비색정량으로 확인하였다.

(6)지방세포전구세포를 분화배지에 IgY, Fab(1:10), Fab(1:25), TNF-α 그리고 리놀산을 첨가하여 분화도를 GPDH 활성과 oil red O 염색으로 측정하였다. 지방세포 전구세포의 분화배지에 첨가된 Fab(1:10) 와 Fab(1:25)는 GPDH 활성 억제는 분화배지의 이들값들에 비해서 40%-190%를 억제하였고 첨가된 IgY 같은 효과를 나타내었다.

대조로 분화배지에 첨가된 TNF-α는 GPDH 활성을 억제하였고 리놀산은 GPDH 활성을 증가시켰다.
(7)분화세포에 함유된 지방구의 Oil red O 염색사진도 GPDH 활성과 유사한 경향을 보였다. 따라서 항지방세포막단백질-IgY유래 Fab는 지방세포전구세포의 분화억제역할을 하였다.
(8) 본 실험결과는 펩신으로 Fc 조각이 완전히 분해되어 생성된 Fab가 항돼지지방세포막단백질-IgY가 지방세포전구세포에 대하여 같은 경향의 분화억제 효과를 나타내므로 항돼지지방세포막단백질 IgY가 Fc 조각과 보체와의 반응메커니즘이 아닌 다른 메커니즘으로 그 분화억제 효과를 나타낼지도 모른다는 것을 시사하고 있다.
(9) 상기 연구 성적은 IgY 대신 Fab를 사용하여도 지방세포의 분화억제와 지방축적감소에 작용할것이라는 것을 나타내었다.

5. 사료중첨가된 IgY에 대한 자돈에서의 항IgY혈청 생산

목적 : 지방세포 전구세포의 분화를 In vitro에서 항지방세포막단백질IgY가 억제하였 으므로 이 IgY의 산업적 이용을 목적으로 in vivo에서 항체와 담체 혼합물이 함유된 사료급여시의 항-IgY혈청이 생성되는지에 대하여 확인하였다.
방법 :IgY 또는 IgG와 담체1 또는 담체2 혼합물이 함유된 사료를 급여하여 사료급여시의 자돈 과 부로일러에서의 모델실험을 실시하고 그결과를 바타으로 다시 자돈에서의 모델실험을 실시하였다.

결과
1. 담체의 스크리닝을 위한 모델로 항체 또는 담체에 대한 항혈청 생성되는지 부로일러에 담체1 또는 담체2와 IgG가 함유된 사료를 4주간 급여하여 조사되었다. 항-IgG혈청의 반응성이 10배로부터 80희석 배율까지 있었으며 항-담체2혈청의 반응성은 매우 높았다. 담체1 또는 담체2가 성장,사료효율, 간장 및 비장무게에 영향을 미치지 않았다. 이 결과를 기초로 담체1 과 담체2를 자돈의 항-IgY혈청 생산의 모델 실험을 실시 하였다.
2. 자돈에서 사료중 담체 1 또는 담체 2는 항IgG(토끼항체) 또는 IgY혈청의 반응성을 8배 로무터 1,280배의 회석배율에서 있었다. 항담체혈청의 반응성은 1,280로부터 256,000배가 되었다. Immunoblot 결과 항-IgY혈청은 IgY와 확실히 반응하였다.
3. 본연구 결과는 담체1 과 담체2는 자돈에서의 항-IgY-혈청 생성을 시킨다는 것을 나타내었다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구개발결과

1. 지방세포전구세포의 분화를 억제하는 IgY와 Fab 생산방법의 확인.
2. IgY의 대량생산을 위한 Idiotype IgY의 생산방법의 개발.
3. 자돈에서 대조 IgY를 이용하여 항IgY혈청이 생산(체내전이)되는 기초 데이터 확인.

연구개발결과의 활용에 관한 건의

1. 실제 양돈업에서의 산업적이용을 위한 IgY의 활용성에 관한 기초 확립이 필요.
   - 항지방세포막IgY와 Fab를 이용하여 돼지에서 항IgY 및 항Fab혈청생산의 지속성 확인 실험이 필요.
   - 체내 전이된 항체는 지방세포전구세포의 수를 감소 시키는가.
   - 실제 체지방함량을 감소시킬것인가.
   - 자돈의 성장률을 증가 시키고 사료효율을 증가 시킬것인가 .
   의 확인실험이 필요
2. 항IgY 혈청 및 항Fab혈청이 생성되는 기초이론 확립이 필요

편집순서 4

SUMMARY(영문요약문)

Ⅰ.Theme :

Immunological and Biochemical Approach for the Regulation of Fat Biosynthesis and Accumulation in Swine

Ⅱ.The Goals and The Importance

Goal

For the improvement of performance regulating the energy metabolism the reducing of the fat accumulation in swin and animals,

1. The development of the egg immunogrobulin(IgY)
2. The investigation of ways to utilize the IgY

Importance

1. The reduction of fat accumulation increase feed efficiency(gain/feed) by the IgY may improve the performance of the swine industry making the best quality of pig meat.

2. The research results may propose the basis of production of the functional pig meat and the development of other livestock products.

3. The results may increase the values of the layer egg industry.

Ⅲ. The Contents and Range of the Approach

1. The Production of Anti-3T3L-1 Cell Membrane Protein Yolk Immunoglobulin (IgY) and the Control of Adipocytes Differentiation in Mouse

In order to establish a model for the control of adipocytes differentiation by using antibody produced from egg yolkk, the emulsion of membrane protein of 3T3L-1 cell membrane protein with the complete Freund's adjuvant for the first immunization and with the incomplete Freund's adjuvant for the second and third boosting with two weeks intervals were injected in layer. After 4 weeks of the

first immunization, eggs were collected and antibody (IgY) was purified from egg yolk. The IgY was purity of 60-98% determined by single radial immunodiffusion (SRID) methods and showed high reactivity with the preadipocytes membrane protein assayed by ELISA. When the IgY was added in the test media containing either 2.5% porcine serum or 10% FBS(control), the differentiation of 3T3L-1 cells and GPDH activities was significantly decreased compared to the control cells. When mice were subcutaneously injected with the IgY for 3 weeks, adipose tissue mass around ovary was tended to be decreased in female mice compared to those of control mice. The results indicated that the egg immunogobuin (IgY) raised against 3T3L-1 cell membrane protein may decrease the differentiation of 3T3L-1 cells in vitro and fat accumulation in the female mouse.

2. The Influence of Egg Immunoglobulin (IgY) on the Differentiation of Adipocyte Precursor Cells of Swine

The function of egg antibody (IgY) on the regulation of fat accumulation or differentiation of adipocyte precursor cells was studied.

The IgYs against adipocyte precursor cells, adipocyte plasma membrane protein and the differentiated adipose precursor cell lysates was raised in layer.

Egg immunoglobulin (IgY) against the precursor cell, adipocyte plasma membrane protein and the differentiated adipocyte precursor cells (Glucose-IgY, C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY, and NE-IgY) was raised. The reactivity and specificity of the purified IgY with the antigens was determined by ELISA, electrophoresis, immunoblot and immunohistochemistry. The differentiation of adipocyte precursor cells from piglet was induced with the insulin. The influence of IgY with the adipogenic and antiadipogenic substances on the differentiation of adipocyte precursor cells was compared. The differentiation of the adipocyte precursor cells was assayed counting the differentiated cell number and assaying the GPDH activity.

Anti-adipocyte precursor cell serum and IgY had higher reactivity compared with those in control, while any difference was not found among precursor cells from the subcutaneous, abdominal and perirenal adipose pads. Anti-adipocyte plasma membrane protein-IgY gave higher reactivity than anti-precursor cells-IgY. Reactivity of the IgY increased gradually with weeks of immunization passed.

Influence of adipogenic glucose and linoleic acid (C18:2), and antiadipogenic

retinoic acid (RA), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and norepinephrine (NE) on the differentiation of adipocyte precursor cell was investigated. Glucose and linoleic acid in the medium increased the differentiated cell numbers while significant effect on GPDH activity was not found. Retinoic acid (RA), TNF-α and norepinephrine (NE) reduced the differentiated cell numbers, while the GPDH activity was not influenced by the RA but decreased significantly by the TNF-α and NE.

The glucose-IgY in the medium increased the differentiated cell numbers, while C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY and NE-IgY generally decreased the differentiated cell numbers and GPDH activities. The fluorescence of adipocyte precursor cell reacted with the the IgY against the differentiated cells was clear, while the crossreactivity of liver, kidney and spleen with the IgY was unclear.

3. Function of egg immunoglobulin (IgY) against anti-swine adipocyte membrane protein rabbit IgG on the differentiation of adipocyte precursor cells of swine

In order to regulate the energy metabolism and accumulation of fat for the improvement of animal performance, the function of egg immunoglobulin (Idiotype IgY) raised against anti-porcine adipocyte plasma membrane protein rabbit IgG on the differentiation of swine adipocyte precursor cells was studied. Egg immunoglobulin (IgY) against 50 ug of porcine adipocyte plasma membrane protein and the egg immunoglobulin (idiotype IgY) raised against anti-porcine adipocyte plasma membrane protein rabbit IgG 10 ug or 50 ug were raised, respectively. The affinity of IgY, IgG and idiotype IgY were assayed by ELISA. The GPDH (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase) activity and Oil Red O staining of adipocyte precursor cells incubated with testing medium and differentiation medium (testing medium with insulin) were compared with those incubated with the differentiation medium added glucose, TNF-α, IgY, IgG and idiotype IgY.

The affinity of the IgY was not highered significantly after the immunization to 4 weeks of the first boosting, but was increased to the sensitivity of 312 ng in 8 weeks of the second boosting and was shown a plateau values thereafter to 12 weeks. The idiotype IgY raised against 10 ug and 50 ug IgG have shown the identical affinity of 2.0 ng in 12 weeks after the first immunization and 2 times of boosting. The affinity of idiotype IgY was increased gradually ($P < 0.01$) with the weeks of immunization passed after 2 weeks to 12 weeks. The adipose tissue

adipocyte precursor cells of abdominal and back subcutaneous incubated with the differentiation medium and the differentiation medium with raising glucose level had significantly ($P<0.05$) higher GPDH activity and stained more the red areas of Oil Red O staining compared with those incubated with the testing medium. The adipocyte precursor cells of abdominal and back incubated with the differentiation medium added TNF-α, IgG, IgY and idiotype IgY gave significantly ($P< 0.05$) lower GPDH activity and smaller the red areas of Oil Red O staining. The idiotype IgY showed the lowest GPDH activity and the smallest the red area of Oil Red O staining among media with IgG, IgY and idiotype IgY. The results indicated that anti-porcine adipocyte plasma membrane egg immunoglobulin (IgY) and idiotype IgY raised against anti-porcine adipocyte plasma membrane rabbit IgG decreased GPDH activity and reduced the red area of Oil Red O staining. It may show that the IgY decrease biosynthesis and accumulation of triglyceride during the differentiation of swine adipocyte precursor cells to adipocyte.

4. Function of Fab` Fragment from Anti-Porcine Plasma Membrane Protein IgY

The Fab` fragment from anti-porcine adipocyte plasma membrane protein IgY by pepsin digestion was characterized. Laying hens were stimulated of immun response injecting of 100 ug of porcine adipocyte plasma membrane protein and boosted 2 times for 4 weeks interval during 12 weeks. The anti-porcine adipocyte plasma membrane protein IgY was purified and digested in pepsin with IgY of ratio(w/w), 1:1, 1:5. 1:10 and 1:25. The fragment obtained were characterized by ELISA, nondenaturing polyacrylamide gelelectrophoresis and immunoblotting. Function of Fab` fragment on the proliferation of porcine adipocyte precursor cells was determined by MTT assay. Porcine adipocyte presursor cells were incubated in differencitation medium containing the IgY, Fab(1:10), Fab(1:25) TNF-α and linoleic acid. The pepsin with same amount of IgY(1:1) digested random position of IgY. The pepsin and IgY ratio of 1:10 and 1:25 remained Fab` fragment 59.4kDa. The reactivity of the 59.4 kDa fragment with the adipocyte plasma membrane protein by ELISA were given at 1,024 dilution (31ng) showing no difference with the IgY. The 59.4kDa fragment combined with the porcine adipocyte plasma membrane protein strongly by immunoblotting showing same result with the IgY. The results indicated the 59.4kDa fragment is derived from the anti-adipocyte membrane protein-IgY. The Fab` fragment decreased the

proliferation of porcine back($p<0.05$) and abdominal subcutaeous adipocyte precursor cells. The Fab(1:25) and the TNF-α decreased the differentiation of the abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells to adipocyte significantly($p<0.05$) decreased the differentiation of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells. The results indicated 59.4kDa fragment of IgY will be Fab` fragment. And the Fab` fragment decreased the proliferation of adipocyte precursor cells and the differentiation of adipocyte precursor cells. In conclusion, the Fab` may function same as the IgY and the IgY may function without Fc fragment of immunoglobulin.

5. Production of anti-IgY serum by Feeding in Pigs

In order to utilize the anti-adipocyte membrane protein IgY in swine industry, the reactivity of anti-IgY serum by feeding was evalulated in pigs.
Diets containing the compounds of the IgY and vehicle 1 or vehicle 2 was fed on the newly hatched broiler or newly birth pigs during 4 weeks-old, respecively. The reactivity of anti-IgY-serum was assayed by ELISA and immunobotting.

1. For the screerining model of vehicles to transfer the IgY, diets containig a compouds of IgG(rabbit) with vehicle 1 or vehicle 2 was fed on broiler bird during 4-week-old. Anti-IgG serum had 10 to 80 dilution of affinity and the reactivity of anti-vihicle 2 serum was high. Vehicle 1 and Vehicle 2 did not affect growth, feed efficiency, and weight of liver and spleen during 4 weeks of feeding. The results was used as basis of production model in pigs for anti-serum using vehicle 1 and vehicle 2.

2. Diets containing a compound of IgY and vehicle 1 or vehicle 2 was fed on pigs during 4 week old. Anti-IgY serum gave 8 to 1280 dilution of affinity. And the reactivity of anti-vehicle was high. The immunoblot showed the anti-IgY serum had high reactivity with the IgY during 4 weeks of feeding.

3. The results indicated the vehicle 1 and vehicle 2 have synergic effect raising anti-IgY serum in pigs.

CONTENTS(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction 17

Section 1. Purpose and and scope of study 17

1. Goals of research development 17

2. Yearly aims of study 17

Section 2. Regulation of body fat accumulation in animals 18

1. Diet consumption and adipocyte 18

2. Growth of adipose pad 18

3. Practical growth control 19

4. Goals of research and importance 19

Chapter 2. The Production of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Raised against 3T3L1 Cell Membrane Protein and the Control of Adipocytes Differentiation 20

Section 1. Abstract 20

Section 2 Introduction 20

Section 3 Material and Methods 21

Section 4 Results and Discussion 23

Section 5 References 29

Chapater 3. The Influence of Egg Immunoglobulin (IgY) on the Differentiation of Adipocyte Precursor Cells of Swine 31

Section 1. Abstract 31

Section 2 Introduction 32

Section 3 Material and Methods 33

Section 4 Results and Discussion 37

Section 5 References 57

Chapter4. Function of egg immunoglobulin (IgY) against anti-swine adipocyte plasma membrane protein rabbit IgG on the differentiation of adipocyte precursor cells of swine 62

Section 1. Abstract 62

Section 2 Introduction 63

Section 3 Material and Methods 63

Section 4 Results and Discussion 65

Section 5 References 87

Chapter 5. Function of Fab` Fragment of Anti-Porcine Plasma Membrane Protein IgY Digested by Pepsin 89
Section 1. Abstract 89
Section 2 Introduction 89
Section 3 Material and Methods 90
Section 4 Results and Discussion 93
Section 5 References 110
Chapte 6. Production of anti-IgY serum by Feeding in Pigs 115
Section 1. Abstract 115
Section 2. Introduction 115
Section 3 Material and Methods 116
Section 4 Results and Discussion 117
Section 5 References 135

목 차

제 1 장 서 론 17
제 1 절 연구개발의 목적과 범위 17
1. 연구개발목적 17
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 17
제 2 절 동물의 체지방 축적량 조절- 국내외 관련기술 현황 18
1. 지방세포와 사료섭취량 18
2. 지방조직성장 18
3. 조직성장조절의 실제 19
4. 본연구의 목적 과 필요성 19
제 2 장 3T3L1세포의 막단백질에 대한 난황면역글로뷸린 (IgY)의 생산과 지방세포의 분화 조절작용 20
제1절 적요 20
제2절 서론 20
제3절 재료 및 방법 21
제4절 결과 및 고찰 23
제5절 참고문헌 29
제 3 장 돼지 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 계란항체 (IgY)의 작용 31
제1절 적요 31
제2절 서론 32
제3절 재료 및 방법 33
제4절. 결과 및 고찰 37
제5절 참고문헌 57
제 4 장 돼지지방세포 전구세포의 분화에 미치는 항 - 항돼지 지방세포 막단백질 토끼 IgG- IgY의 작용 62
제1절 적요 62
제2절 서론 63
제3절 재료 및 방법 63
제4절 결과 및 고찰 65
제5절 참고문헌 87

제5장.항돼지지방세포세포막 IgY의 펩신분해로 생성된 Fab` 조각의 기능 89
제1절 적요 89
제2절 서론 89
제3절 재료 및 방법 90
제4절 결과 및 고찰 93
제5절 참고문헌 110
제6장 사료중첨가된 IgY에 대한 자돈에서의 항IgY혈청 생산 115
제1절 적요 115
제2절 서론 115
제3절 재료 및 방법 116
제4절 결과 및 고찰 117
제5절 참고문헌 135

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발목적

가. 생산된 IgY에 의한 돈육중 지방생합성제어 방법 개발
- 돼지의 지방세포에서의 지방축적을 감소시키기 위하여 가금을 이용하여 항 돼지지방세포막 단백질 항체(IgY)를 생산하여 돼지의 지방축적량감소에 이용한다.

나.돼지에서의 IgY에 대한 항혈청 생성 담체의 확인 과 이용

다.항원 과 항체의 대량생산방법 개발

2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1996)	항체 스크리닝 시스템개발	3T3L1 및 Primary지방세포에 대한 항체생산,항체정제모델 정립
2차 년도 (1997)	지방세포성장억제항체 개발 정제 및 생산	Primary지방세포증식 억제항체스크리닝, 막단백질정제, Immunobloting. Immunohistochemisty
3차 년도 (1998)	지방세포성장억제항체정제방법	특이항원 과 항체 스크리닝, Immunobloting. 항체의 in vivo 생물반응 모델
4차 년도 (1999)	생산된 항체의 이용방법연구 (산업화)	특이항체 이용방법 연구. 특이항원항체생산연구 항체의 in vivo 적용방법 연구
5차 연도 (2000)	생산된 항체의 이용방법과 메커니즘연구(산업화)	o항체의 대량생산과 반응성 향상.- 소량항원으로대량항체(IgY,Idio-typeIgY)생산연구.- 지방세포분화및조직특이성에미치는IgY및 Idio-type IgY의 영향 o Fab의 생산 A향상 - 지방세포분화 및 특이성 o성장중인 동물에서 담체의 연속적 자극과 항혈청 반응성 - 담체 1, 담체 2 의 항혈청생산 영향 - 가금에서의 모델 실험 - 돼지지방모델 실험

제 2 절 동물의 체지방 축적량 조절 국내외 관련기술 현황

1. 지방세포와 사료섭취량

동물에서 사료섭취량의 조절은 에너지균형 조절과 증체조절에 중심적인 역할을 한다. 사료섭취량은 포만 (飽滿) 인자 (Satiety factor)의 작용으로 시상하부에서 조절된다 (Hervey등, 1959). 사료섭취량의 단기조절은 장에서 생성되는 콜레시스토키닌 (Cholestokinin)이 포만신호가 되어 중추신경계에 작용하여 사료섭취량이 감소하고 (Woods등, 1998), 장기조절을 위한 기아 (飢餓)와 포만 (飽滿) 신호는 시상하부에서 생성된 뉴로펩타이드 Y (Neuropeptide Y : NPY) 와 지방세포에서 생성된 려틴 (Leptin)에 의해서 이루어진다. 절식 동물의 시상하부에서 NPY의 생성이 증가하며, NPY를 주사하면 중추신경에 기아 (飢餓) 인자로 작용하여 사료섭취량과 증체를 증가시킨다. 지방세포에서 생성된 려틴은 혈류로 방출되는 포만인자로서 시상하부에 작용해서 NPY의 생성을 저해하여 사료섭취량과 체중을 감소시킨다(Figlewicz등, 1996).

2. 지방조직성장

근육조직과 지방조직의 성장정도는 동물의 성장단계에 따라 다르다. 출생 후 근육조직의 성장은 근육 섬유아세포의 증생 (Hypertrophy)이나, 지방조직의 성장은 증생과 더불어 증식 (Hyperplasia)이 동반된다 (Roche와 Quirke, 1986). 근육 성장은 연령경과에 따라 감소하여 연령과 반비례한다. 성숙된 동물의 체중증가는 60%이상이 지방조직의 성장이다. 지방조직은 지방세포 (fat cell), 지방세포 전구세포 (adipocyte precursor cells), 혈관의 내피세포 (endothelial cells), 비만세포 (mast cells), 그리고 대식세포 (macrophage)등으로 이루어진다. 이들중 지방세포가 가장 많은 세포이다 (Vernon과 Clegg, 1985). 백색지방조직(White adipose tissue)의 발달은 태내 자돈에서 연구되어왔다(Hausman등, 1987). 지방조직 중 지방세포 전구세포와 다양한 fibroblast 유래의 미분화된 세포주(cell line)들은 triacyglycerol 생합성과 동원에 관여하는 효소를 합성하지 않는다. 이들을 배양증식하여 군집(confluence)하면 분화가 일어나고 지질합성과 동원에 관련된 효소가 생성된다. 지방세포전구세포의 지방세포로의 분화과정에서는 세포내 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)의 활성이 수백 배로 증가한다(Kuri-Harcuch 등, 1978). 이때부터 지방세포대사에 영향을 미치는 호르몬의 반응으로 지질을 계속 축적한다. 지방이 지방세포 내에 축적되면 세포골격 단백질의 합성능력이 상실되면서 동시에 fibroblast 모양으로부터 구형의 지방세포 모양으로 변한다(Cryer, 1982).

3. 조직성장조절의 실제

반추동물 (Baile등, 1987), 돼지 (Houpt, 1985) 그리고 가금 (Forbes, 1985)의 성장 중에 사료섭취량이 증가하면, 지방축적량이 많아진다. 축산물의 생산효율은 체지방 축적율이 증가하면 낮아지고, 근육생산이 증진되면 높아진다. 성장홀몬등 홀몬류와 신경전달물질인 아드레날린 β- 수용체 유사물질인 Cimaterol은 축산물의 생산효율 향상을 위한 생리조절제로서 사용이 시도되었다 (Futter등, 1990). 이들을 이용하여 생산된 축산물의 인체에 대한 안전성이 검증되지 않아 β- 수용체 유사물질등은 유럽과 미국에서 사용이 허가되지 않았다 (Warries등, 1989).

최근에는 안전성이 보다 많이 보장되는 방법으로서 Flint 등(1986)은 항지방세포 혈장막단백질의 단클론 또는 다클론 항체가 지방세포 전구세포의 분화를 억제한다고 보고하였다. 이러한 방법중의 하나가 지방세포 막단백질에 대한 단클론 또는 다클론항체로 지방세포 전구세포의 분화를 조절하는 것이다. 지방세포 막단백질을 항원으로 하는토끼 (Dulor등, 1990), 양 (Moloney등, 1989), 돼지 (Kestin등, 1993), 가금 (Dong등, 1991)에서 다클론 항체가 생산되었다. De clercq (1997)등은 항돼지 지방세포 막단백질 단클론 항체가 in vitro에서 돼지의 지방세포 전구세포의 분화를 감소시킨다는 성적을 보고하였다.

4. 본연구의 목적 과 필요성

채란계에 항원을 주입하여 생산된 항체는 계란(IgY)에 이행한다. 계란은 대량 생산되므로 IgY도 대량 생산되어, 이것은 산업적인 관점에서도 돼지의 지방 생합성 제어에 이용가능하다고 가정하였다. 토끼등을 이용한 포유동물로부터 채혈에 의한 항체의 생산은 산업적인 대량생산에 이용하기 어렵다. 본 연구는 계란에 항 지방세포 항체를 이행시켜 이것을 면역조절(Immunomodulation) 방식으로 돼지의 지방축적제어에 이용할려는 것으로, 계란의 생산증가는 언제나 가능하므로 산업적으로 이용 가능한 기술이 될것이다.

경제·산업적 측면: 돼지의 지방축적 억제에 의한 사료효율 향상: 고급 육(기능성육)의 생산으로 소비자의 기대에 보답하고 수출산업의 육성에 도움을 주므로서 양돈업의 국제경쟁력 향상. 계란의 기능성이 증가하여 채란 양계업의 부가가치 향상된다.

사회·문화적 측면 : 산업화된 풍요한 사회에서 많이 발생하는 비만증, 당뇨병, 고혈압등 성인병의 원인중 하나는 지방세포 대사의 부조화에 의한 것이다. 지방세포의 대사를 조절하는 항체 연구는 건강한 사회를 지향한 사람의 성인병의 연구와도 관계가 있다.

제2장. 3T3L-1세포의 막단백질에 대한 난황 면역글로불린 (IgY)의 생산과 지방세포의 분화조절작용

제1절 적요

본연구는 계란항체를 이용하여 지방세포의 분화를 조절하기 위한 모델을 평가하기 위하여 수행되어졌다. 면역 : 산란계에 3T3L1 세포주의 막단백질과 complete Freund's adjuvant 그리고 imcomplete Freund's adjuvant의 유화액으로 각각 최초면역한뒤에 2주간격으로 두 번 추가면역하였다. 최초면역후 4주후부터 계란을 수집하였다. 분리 정제된 계란항체(IgY)의 순도는 SRID법으로 측정되었으며 60-98%였다. ELISA법으로 평가된 항체(IgY)는 3T3L1 세포주의 막단백질과 매우 높은 반응성을 나타내었다. 2.5% Porcine serum 또는 10% FBS가 함유된 3T3L1세포의 분화유도배지에 IgY를 첨가하면, 3T3L1세포의 분화와 GPDH활성은 대조구에 비하여 유의하게 ($P > 0.05$) 감소하였다. 마우스에 IgY를 1주에 1회씩 3주간 피하에 주입하면, 암 마우스의 난소주위 지방조직량은 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 계란항체 처리로 3T3L1세포의 분화와 암마우스에서는 지방축적을 제어 가능서을 암시한다.

제2절 서론

가축에 과다한 지방 축적은 식육생산산업에 있어서 고비용을 초래한다. 체지방을 감소시키기위한 영양학적(Lhuillery et al., 1988, Becker et al., 1986), 호르몬적 (Warriss et al., 1990), 생리학적 (Dauncey et al., 1983)방법들을 포함한 여러가지 연구들이 수행되어져 왔다. 도체중 단백질함량의 증가를 위해서 β-adregenic 아고니스트와 성장호르몬(Futter et al., 1990 ; Warriss et al., 1989.)을 이용하여 성과를 거두었다. 그러나 성장호르몬의 경우는 정기적인 주입이 필요하고, 다른 호르몬에서는 부작용(Warriss et al., 1989, 1990) 때문에 유럽연합에서는 이러한 제제들의 사용이 금지되었다.

지방세포 막 단백질에 대한 다클론 항혈청으로 지방세포의 세포독성효과를 이용하

여 체지방함량을 조절하는 연구가 발표되었다 (Declercq et al., 1997; Butterwith et al., 1989; Flint et al., 1986). 성장중인 쥐(렛트)와 돼지에 지방세포 막 단백질에 대한 항혈청을 수동면역시키면, 지방세포의 광범위한 용해가 일어나서 체지방감소를 유도할수 있다고 하였다. 그러나 면역 과 채혈에 의한 항혈청생산은 사용가능한 항혈청의 생산량에 제한이 있다. 그뿐만 아니라 동물에게 많은 스트레스를 주며 동물복지에도 문제가 제기된다. 암탉은 간에서 생산한 혈청 면역글로부린을 난황에 이행시켜 병아리에게 면역력을 제공한다는 것은 잘 알려져 있다. 계란항체는 난황으로부터 쉽고 빠르게 분리할수 있다는 것은 이미 잘 알려져 있다 (Akita et al., 1992). 최근 수동면역요법분야에서 여러 질병을 방지하기 위해 경구 투여법을 이용한 계란항체의 실제적용이 소개되었다 (Bartz et al., 1980). 이러한 경우에 있어서는 손쉬우면서도 대량의 계란항체의 공급이 요구되어진다. 본 연구는 계란항체생산의 모델시스템을 만들고 3T3L1세포 막 단백질에 대한 가금 계란항체를 이용하여 마우스의 체지방 축적의 조절이 가능한지를 조사하기 위해 수행되었다.

제3절 재료 및 방법

1. 세포배양 및 분화유도

3T3L1 마우스 섬유아세포주는 습도가 조절되고 이산화탄소가 대기중 5% 함유된 조건에서 10%의 FBS가 함유된 DMEM배지로 배양되었다. 5×106 개의 세포들이 2.5%의 porcine serum이나 10%의 FBS가 함유된 시험배지에서 배양되었고, 인슐린 (10 ug/mL), IBMX (0.5 mM), Dexamethasone (0.25 uM)를 첨가한 분화 유도배지에 계란항체를 5 ug/mL의 농도로 첨가하였다. 시험배지는 이틀간격으로 7-10일간 교체하였다.

2. IgY 생산 및 정제

막 단백질을 제조하기 위하여 8 mL의 막 추출완충액 (40 mM HEPES, 1% TritonX-100, 10% Glycerol, 5 uM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT)에 6×107개의 3T3L1세포를 넣고 Dounce 균질기로 균질화하였다. 균질화된 세포액은 100,000 g, 4℃에서 1시간 원심하여 얻은 펠렛을 0.85% 식염수에 현탁하여 제조된 막단백질은 단백질농도 측정 후에 사용전까지 -70℃에 보관하였다.

77주령의 Isa Brown종 산란계 10수에 막 단백질 250 ug과 complete Freund's adjuvant로 조제한 유화액 1 mL를 최초면역시켰으며, complete Freund's adjuvant와 동일한 막 단백질로 제조한 유화액을 2주간격으로 2번 더 추가면역시켰다.

계란항체는 Hatta등 (1990)의 방법에 의해 분리되어졌다. 난백으로부터 난황을 분리

하여 알부민등을 제거하기 위하여 증류수로 난황을 세척하였고 부착되어있는 난백을 제거하기 위하여 세척한 난황을 페이퍼타올 위에 올려 놓고 굴렸다. 난황막에 구멍을 뚫어 난황막이 섞이지 않게 난황을 코니칼 튜브에 넣었다. 난황은 난황과 같은 량의 증류수로 희석하였다. 혼합물은 다시 난황 용적의 4배량의 0.15% λ-carrageenan과 섞어 4℃에서 15시간 이상 정치하고 4,000 g, 15분간 원심하였다. 상등액을 여지를 이용해 여과한 뒤 침전이 생길때까지 포화 암모늄 설페이트 용액을 첨가하였다. 4,000 g, 15분간 원심시킨후 상등액을 따라내고 난황용적 4배량의 PBS로 현탁하였다. 현탁액의 18%량 (W/V)에 해당하는 Na2(SO4)2 파우더를 첨가하였다. Na2(SO4)2 파우더가 완전히 용해될때까지 혼합물을 교반기에서 교반한 뒤 4,000 g, 15분간 원심하였다. 펠렛은 난황용적 2배량의 PBS에 녹였다. 0.45 um의 막필터를 이용하여 여과한 뒤 다음 실험을 위해서 단백질농도를 측정한다.

3. Single Radial Immunodiffusion (SRID) Assay

Radial immunodiffusion은 McCannel과 Nakai의 방법에 의해 분석되었다. 2.5 mg/mL의 토끼 anti-chicken IgG anti-sera를 함유한 1% agarose gel을 제조하여 RID 플레이트에 부었다. 6 uL의 희석된 시료와 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL의 표준물질을 직경 3 mm의 well에 넣었다. 알려지지 않은 시료의 계란항체농도는 표준물질의 각농도별 면적에 의해 작성된 기본곡선을 참고하여 결정되어졌다.

4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA는 Shimizu등(1988)이 서술한대로 수행되었다. Carbonate/bicarbonate 완충액에 현탁한 막단백질을 플레이트 well당 0.5 ug씩 코팅하여 4℃에서 하룻밤 배양하였다. 플레이트는 PBS-T (0.05% Tween-20)로 3번 세척하고 다음과정으로서 블로킹 완충용액 (0.17 M H_3BO_3, 0.12 M NaCl, pH 8.5, 0.05% Tween-20, 0.25% BSA, 0.05% NaN_3)을 well당 100 uL씩 넣어 37℃에서 30분간 배양하였다. 플레이트들은 정제된 계란항체를 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 플레이트들은 PBST로 3번 세척하고, well당 100 uL의 anti-chicken IgG (Alkaline phosphatase - Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, 1 : 500 in PBST)를 첨가하였다. 37℃에서 1시간 배양뒤에 PBST로 플레이트를 2번 세척하고 50 uL의 기질용액 (0.1% p-nitrophenyl phosphate disodium in glycine buffer : 0.1 M glycine, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mM $ZnCl_2$, pH 9.8)을 첨가하였다. 친화성은 0.5 M의 NaOH 50 uL첨가에 의해서 정지되었다. 흡광도는 ELISA 측정기를 통해 405 nm에서 측정되었다 (BIO TEC EL311SL).

5. In vivo Administration of IgY

3주령에 이유된 ICR 마우스 숫컷 12마리와 암컷 6마리을 각각 대조구와 계란항체구로 나누어 톱밥을 깔아주고 온도는 21-24℃, 습도는 40-60%, 12시간씩 명암조건으로 플라스틱 케이지에 3마리씩 넣어 사육하였다. 마우스들은 3주간 사료 (Purina Centified Laboratory Chow)와 물을 자유급여하였다. 마우스들은 1주간격으로 3주간 계란항체와 imcomplete Freund's adjuvant로 제조된 유화액 200 uL로 피하 주입되었다. 실험종료시에 증체량과 정소, 난소주위 지방조직을 채취하여 무게를 측정하였다.

6. Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase (GPDH) 활성

냉각된 PBS로 세포들은 두 번 세척하고 0.3 mL의 Tris-EDTA완충액 (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)을 넣고 긁어서 모은다. 세포들은 5초간 초음파분해하여 균질화하고, 13,000 g, 4℃ 조건하에서 5분간 원심한다. 상등액을 분석에 이용한다. GPDH는 Kozac과 Jensen (1975)의 방법에 의해 분석하였다.

7. 통계처리

얻어진 값들은 SAS (1985)의 GLM으로 분산분석하고 평균값들간의 유의성은 은 SAS의 LSD값이나 student's t-test로 결정하였다.

제4절 결과 및 고찰

1. IgY의 수율 과 순도

생산된 계란항체의 농도와 순도를 Table 1에 나타내었다. 난황을 두배로 희석하고 0.15% λ-carrageenan용액을 첨가하여 원심분리하여 난황의 주요성분인 지단백을 침전시켰다. 상등액층의 계란항체의 순도는 60-98%이다. Hatta (1990)등은 계란 한 개당 항체 량은 약 70-100 mg이며 황산소다로 세 번 제염하면 순도는 98%이상이 된다고 하였다. 계란 난황 과립자들로부터 수용성 혈장단백질 층을 형성하기 위해 증류수로 난황을 희석하면 수용성층에서 IgY의 회수율은 90%이상이다. 계란항체의 생산에 있어서 본 실험의 데이터는 Hatta (1990)등의 결과와 유사하였다. 면역시킨 산란계로부터 1주일간 6개의 계란을 수집하면 상당한 양의 계란항체(IgY)를 얻을 수 있다는 것을 의미한다. 이는 채혈의 스트레스 없이 대량의 계란항체를 난황으로부터 쉽게 분리할 수 있었다.

Table 1. The concentration of egg yolk immunoglobulin (IgY) raised against 3T3L-1 cell.

	Total protein	Total IgY	Recovery	Purity of IgY
	mg/mL	mg/mL	%	%
Supernatant*	235±10.0	45±3.7		
After desalting	45±5.0	32±2.7	71.1	60-98

3 replicates
Initial egg yolk was mean±SE(13.0±1.51 mL).
* Supernatant : The doubly diluted egg yolk was mixed with 0.15 % λ-carrageenan solution(four times of egg yolk) and stood over night in refrigerator. The mixture was then centrifuged at 10,000 × g for 15min. The supernatant was then filtered through a filter paper.

2. IgY의 친화성

생산된 IgY의 친화성은 Figure 1과 2에 보이고 있다. 대조로 사용된 계란항체와 비교해서 항3T3L1지방세포 전구세포 막단백질-IgY의 친화성은 1 : 2048희석농도로서 50 ng of IgY/well이 되었다. 이 결과는 최초면역후 4주면 반응성이 높은 계란항체를 생산할수있다는 것을 나타낸다.

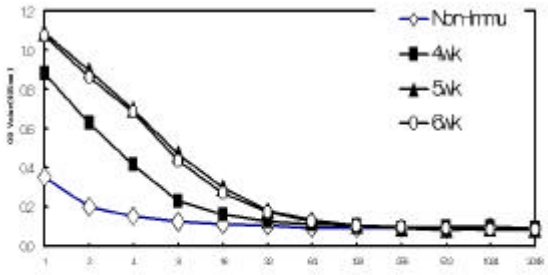


Figure 1. Reactivity of various IgY raised against 3T3L-1 cell membrane proteins toward 3T3L-1 cell membrane proteins as

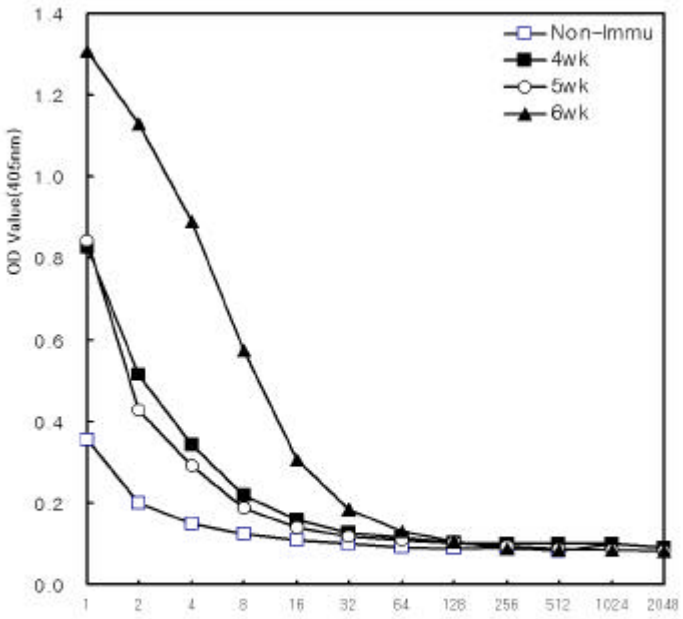


Figure 2. Reactvity of various IgY raised against 3T3L-1 cell membrane proteins toward 3T3L-1 cell membrane proteins as determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA).

3. 세포분화에 미치는 항-3T3L1-IgY의 작용

2.5% porcine Serum 또는 10% FBS가 함유된 시험배지에 인슐린 (10 ug/mL), IBMX (0.5 mM), Dexamethasone (0.25 uM)을 첨가하여 3T3L1세포들의 분화를 유도하였다. 분화배지에 항-3T3L1-IgY를 5 ug/mL농도로 첨가하였다. 3T3L1세포주의 지방세포로의 분화는 극적으로 억제되었다 (photo 1-1, 1-2 and 2-1, 2-2). 광학현미경으로 관찰하면 항-3L1-IgY를 분화배지에 첨가하였을때 지방구의 크기와 수는 적었다. 최근 De clercq등 (1997)에 따르면 잘 분화된 stroma vascular 세포를 항 지방세포 단클론 항체에 24시간 노출시키면 보체가 존재하는 혈청이 함유된 배지 또는 혈청이 함유되지 않은 배지에서 돼지 지방세포 전구세포에 대한 세포독성을 나타낸다고 한다.

세포독성효과는 적어도 0.1과 10 ug/mL처리간에서 농도증가에 따른 독성증가효과는 나타내지 않았다. 하지만 그들이 분화전 3일째에 세포에 보체와 항체처리를 했을 때 대조세포들에 비해 분화된 세포들이 적었다. 본 실험에서 우리는 분화발생 첫째날부터 세포에 항체 (5 ug/mL를 처리하였고 세포배양 마지막날인 7일째에 광학현미경

으로 관찰하였을 때 세포용해현상 없이 지방축적의 현저한 억제를 나타냈다.

3T3L1세포의 GPDH활성에 대한 계란항체의 효과는 Table 2에 나타내었다. 인슐린 (10 ug/mL), IBMX (0.5 mM), Dexamethasone (0.25 uM)의 처리에 의해서 FBS함유 배지, porcine serum배지 모두에서 GPDH의 활성이 유의하게 (P> 0.05) 높아졌다. 항-3T3L1세포-IgY가 분화배지에 함유되면 GPDH활성은 유의하게 감소하였다. FBS를 처리한 세포에서도 유사한 결과가 관찰되어졌다.

본 실험에서 항-3T3L1세포-IgY가 5 ug/mL의 농도로 함유되어도 세포독성이 분명하게 관찰되어지지 않았다. 그러나 분화된 세포 수는 감소하였으며, 분화된 지방세포는 지방방울들로 꽉 차지않았다. 지방전환이 세포표면 단백질의 시그널링전환 같은 비 세포독성기전에 의해 down-regulate될수 있는지는 아직 알려지지 않았다. 향후 연구에서는 이러한 관점을 명확히 할 필요가 있다.

Table 2. Effect of IgY raised against the 3T3L-1 cell membrane protein on relative GPDH activities.

Treatment	FBS	Porcine serum
	(mmol/min/μg protein)	
-Ins	15.000±0.500c	15.000±0.500c
+Ins	100.000±0.000a	134.900±21.200a
+Ins +IgY	72.300±0.300b	69.800±1.500b

Values are mean±SE of 3 replicates, FBS : Fetal bovine serum
-Ins : without insulin in media.
+Ins : with insulin in media.
+Ins+IgY : with insulin and IgY(5μg/mL) in media.
Differentiation was induced with insulin(10ug/mL), IBMX(0.5mM) and dexamethasone(0.25uM) in the media containing either 10% FBS or 2.5% porcine serum for 7 days with or without antibody.
a c : Means with a column with no common superscript differ significantly at $p < 0.05$.

4. 마우스의 지방조직 축적에 미치는 항3T3L1-IgY의 작용

항3T3L1세포 막 단백질-IgY는 in vivo 투여를 위해서 새로 만들었다. 3주간 1주에 1회씩 마우스에 항3T3L1세포 막 단백질-IgY를 피하주입하여 능동 면역시키면 Table 3에 보이고 있는 바와같이 체중 100g당 정소주위 지방조직의 무게는 대조구와 계란항체 주입구간에 차이가 없었다. 그러나 암 마우스에서 체중에 대한 난소주위 지방조직의 무게는 항3T3L1세포 막 단백질-IgY에서 감소하는 경향을 나타내었다.

항지방세포막단백질 혈청의 in vivo투여로 체지방축적의 감소는 렛트 (Parton et al., 1990; Hu et al., 1992), 돼지 (Kestin et al., 1993), 소 (Cryer et al., 1984), 닭 (Dong et al., 1991; Butterwith et al., 1989, 1992a), 양 (Nassar and Hu., 1991)등에서 보고된바 있다. 쥐에서 로타바이러스의 전염을 막기위한 계란항체의 경구투여는 성공적으로 이용되어져 왔다(Bartz et al., 1980). 그러나 도체지방함량을 조절하기 위한 in vivo에서의 계란항체의 투여성적은 찾을 수가 없었다.

지방축적을 조절하는 모델시스템을 평가하기 위해 우리는 쥐의 섬유아세포로부터 기원되는 3T3L1세포주의 막 단백질에 대한 계란항체를 제조하여 마우스에 주입하였다. 계란항체의 주입에 의한 체중의 손상은 없었으며, 지방 축적이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 발견은 인간뿐 아니라 양돈산업에 있어서 지방조직 성장의 조절하는 방법으로 도입이 가능할런지도 모른다.

Table 3. Effect of injection of antibody emulsion on the body weight gain and adipose pad accumulation in mouse

	Female		Male		SEM	LSD
	Control	+Ab	Control	+Ab		
Body weight						
Final(g/head)	27.92b	27.12b	34.58a	35.12a	0.94	2.14
Gain(g/period)	4.30b	5.10b	8.20a	7.90a	0.41	2.50
Adipose pad						
g/BW	0.453b	0.307b	0.640a	0.683a	0.046	0.199
g/100g BW	1.631ab	1.095b	1.795ab	1.940a	0.124	0.578
g/Gain	0.105a	0.060b	0.078ab	0.087ab	0.008	0.034

Values are mean of 3 replicates(head).

SEM : standard error of mean

LSD : Least significant difference

+Ab : Injected the emulsion of IgY against 3T3L-1 cell membrane proteins with incomplete freund's adjuvant

a b : Mean with a row with no common superscript differ significantly at $p < 0.05$.

제 5절 참고문헌

Akita EM, Nakai S 1992 Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J. Food Sci. 57:629-634

Bartz CR, Conklin RH, Tunstall CB, Steele JH 1980 Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg immunoglobulin. J. Infect. Dis. 142:439

Becker W, Bruce A 1986 Retention of linoleic acids in carcass lipids of rats fed different levels of essential fatty acids. Lipids 21:121-126

Butterwith SC, Kestin SC, Griffin HD, Beattie J, Flint DJ 1992a Identification of chicken (Gallus domesticus) adipocyte plasma membrane and differentiation specific proteins using SDS-PAGE and western blotting. Comp. Biochem. Biophys. 110B:147.

Butterwith SC, Kestin SC, Griffin HD, Flint DJ 1989 Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors : Lack of tissue specificity. Br. Poult. Sci. 30:371-378.

Cryer A, Gray BR, Woodhead JS 1984 Study on the characterization of bovine adipocyte precursor cells and their differentiation in vitro, using an indirect-labelled-second antibody cellular immunoassay. J. Dep. Phsiol. 6:159

Dauncey MJ, Ingram DL 1983 Evaluation of the effects of environmental temperature and nutrition of body composition. J. Agri. Sci. Camb., 101:351-358.

De clercq L, Mourot JC, Genart V, Davidts, Boone C, Remacle C 1997 An anti-adipocyte monoclonal antibody is cytotoxic to porcine Preadipocytes in vitro and depresses the development of pig adipose tissue. J. Anim. Sci. 75:1791-1797.

Dong J, Froman DP, Hu CY 1991 Development and characterization of polyclonal antibodies against chicken adipocytes. Comp. Biochem. Physiol. 99A:195

Flint DJ, Coggrave H, Futter CE, Gardener MJ, Clarke TJ 1986 Stimulatory and cytotoxic effects of an anti-serum to adipocyte plasma membranes on adipose tissue metabolism in vitro and in vivo. Int. J. Obes. 10:69

Futter CE, Flint DJ 1990 Endocrinological and immnological manipulation of adiposity. In: J. M. Forbes and G. R. Hervey (Ed.) The Control of Body Fat Content. p. 87. Smith-Gordon, London

Hatta H, Kim H, Yamamoto T 1990 A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric. Biol. Chem. 54:2531-2535.

Hu CY, Suryawan A, Killefer J, Wher NB 1992 Effect of antiserum to rat on growth and body composition of the rat. Comp. Biochem. Physiol. 101A:669

Kestin S, Kennedy R, Tonner E, Kiernan M, Cryer A, Griffin H, Butterwith S, Rhind S, Flint D 1993 Decreased fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. J. Anim. Sci. 71:1486-1494.

Kozak LP, Jensen T 1974 Genetic and development control of multiple forms of L-glycero-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 249:7775

kwan L, Li-Chan E, Helbig N, Nakai S 1991 Fractionation of watersoluble and water-insoluble components from egg yolk with minimum use of organic solvents. J. Food Sci. 56:1537

Lhuillery C, Mebarki S, Lecourtier MJ, Demarne Y 1988 Influence of different dietary fats on incorporation of exogenous fatty acids into rat adipose glycerides. J. Nutr. 118:1447-1454.

McCannel AA, Nakai S 1990 Separation of egg yolk immunoglobulins into subpopulations using DEAE-ion exchange chromatography. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 23:42

Nassar AH, Hu CY 1991 Growth and carcass characteristics of lambs passively immunized with antibodies developed against ovine adipocyte plasma membranes. J. Anim. Sci. 69:578

PantonDC,FutterS,Kestin,FlintD 1990 Increased growth and Protein deposition in rats treated with antibodies to adipocytes. Am.J.Physiol.258:E985

SAS 1985. SAS user's Guide: Statistics(Version 5 Ed.).SAS Inst. Inc.,Cary,NC.

Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S 1988 Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk . J. Biochem. 50:473.

Warriss PD, Kestin SC, Rolph TP, Brown SN 1990 The effects of the beta-adrenergic agonist salbutamol on meat quality in pigs. J. Anim. Sci. 68:128.

Warriss PD, Kestin SC, Brown SN 1989 The effect of beta-adrenergic agonists on carcass and meat quality in sheep. Anim. Prod. 48:385

제3장 돼지 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 계란항체 (IgY)의 작용

제1절 摘 要

본 연구는 양돈생산성 향상을 위한 에너지대사 와 지방조직축적의 조절을 위해, 항-돼지지방세포 전구세포, 지방세포 막단백질 및 분화된 지방세포 용해물-계란항체 (IgY)가 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 작용을 조사하였다. 대조로서 지방세포 전구세포의 분화를 촉진하는 포도당 (Glucose), 리놀산 (Linoleic acid:C18:2)과 억제하는 비타민A (Retinoic acid : RA), Tumor necrosis factor (TNF)-α 및 Norepinephrine (NE)이 지방세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 물질들이 함유된 분화배지에서 분화한 지방세포 전구세포를 각각 항원으로 채란계에 면역시켜 생산된 항체(Glucose-IgY, C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY, NE-IgY)가 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 지방세포 전구세포의 분화는 분화세포수와 GPDH의 활성으로 판단하였다. IgY의 항원에 대한 반응성과 특이성은 ELISA, 전기영동, Immunoblot 및 Immunohistochemistry으로 조사하였다.

항지방세포 전구세포-IgY 및 항혈청 (serum)은 대조에 비해서 16배 높은 반응을 보였으나, 피하, 복부 및 신장주위지방조직 유래 항-전구세포-IgY 사이에 유의차는 없었다. 항원주입 후 시간이 경과에 따라 IgY의 반응성이 높아졌다.

분화배지중의 포도당 (glucose)과 리놀산 (C18:2)은 전구세포의 분화세포수를 증가시켰으나, GPDH 활성에는 유의한 영향이 없었고, 비타민 A (RA), TNF-α 및 NE는 분화세포수를 유의하게 감소시켰으며, GPDH 활성은 RA에 의해 유의한 영향은 없었으나, TNF-α와 NE는 유의하게 감소시켰다.

항지방세포 전구세포 막단백질-IgY의 반응성 2048배의 희석배율은 항-지방세포 전구세포-IgY에 비하여 크게 향상되었다. 항분화세포 용해물-IgY인, Glucose-IgY, C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY 및 NE-IgY의 반응성은 512배의 희석배율로서 서로 유의차가 없었다. 분화배지중의 Glucose-IgY는 분화 지방세포수를 높이는 경향이 있었으나 C18:2-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY 및 NE-IgY는 전구세포의 분화 지방세포수와 GPDH 활성을 감소시켰다. 면역형광사진은 항분화 세포-IgY는 지방세포 전구세포와 강하게 반응하였으나, 간장조직, 비장조직 및 신장조직과의 반응성은 매우 약하였다. 분화된 세포용해물(단백질)을 항원으로 한 IgY는 지방조직특이성을 높일 가능성이 있다는 것을 시사하였다.

제2절 緖 論

동물의 생존을 위한 에너지균형 조절과정은 체온이나 혈당조절계와 중복된 조절계(homeostasis)이다. 그러나 에너지균형의 조절은 우선순위가 높다. 사료섭취 또는 대사는 에너지 균형을 조절하는 신호중추신경계와 말초신경 (peripheral sources)에 의해서 조절된다. 성장중에는 반추동물 (Baile 등, 1987), 돼지 (Houpt, 1985) 그리고 가금 (Forbes, 1985)에서 지방축적을 위해 사료섭취량이 증가한다.

지방조직은 지방세포 (adipocyte), 혈관 내피세포(endothelial cells of the blood vessels), 지방세포 전구세포 (adipocyte precursor cells), 비만세포 (mast cells)와 대식세포 (macrophage) 등으로 이루어지며 지방세포가 우점하는 세포이다 (Bjorntorp 등, 1979).

지방세포와 지방조직의 대사는 중성지방 (triacylglycerol)의 합성과 연속적인 가수분해 (lipolysis)이며, 대부분 in vitro계에서 연구되었다 (Vernon과 Clegg,1988). 지방합성의 원료는 대부분 포도당로부터 합성된 지방산과 glycerol 3-phosphate이다. 여러 가지 호르몬이 쥐의 지방세포 대사를 조절한다. 인슐린은 반추동물의 지방조직과 지방세포와는 아주 약하게 반응하나, 양 (Vernon, Clegg과 Flint, 1981)과 소 (Vernon 등, 1985)의 지방세포에 인슐린 수용체 (receptors)의 숫자와 특성은 쥐의 지방조직의 그것과 비슷하다. 인슐린의 생리적 농도에서 in vitro로 지방조직을 단기간에는 영향이 없으나 24시간 이상 배양하면 glucose와 acetate로부터(Vernon 등, 1985) 지방산 합성과 아세트산 CoA탄산화 효소 (acetyl-CoA carboxylase)의 활성이 촉진된다.

광학및 전자현미경적 초기연구에서, 지방세포는 분열하지 않으며, 형태학적으로 선유아세포 (fibroblast) 비슷한 세포에서 유래한다(Wasserman,1965). ^{3}H-thymidine의 방사선은 지방조직의 stromo vascular(S-V) 세포분획에 우선 들어가고 지방세포에서 계속적으로 나타난다 (Hausman, Campion및 Martin, 1980). 쥐, 마우스, 소 및 사람 (Cryer,1982)과 양 (Broad과 Ham, 1983)의 지방조직중 S-V분획은 지방세포로 분화된다. 다른 조직들중의 fibroblast는 지방세포로 발달하지 않는다. 중국 햄스터 배 (胚)의 fibroblast는 adipoblast뿐만 아니라 chondroblasts 및 myoblast로 분화한다. 모든 세포형태들이 처음에는 pluripotent mesenchymal progenitor cell로부터 파생된다 (Sager과 Kovac, 1982).

지방조직과 다양한 fibroblast 유래의 세포주 (cell line)들은 미분화된 작은 세포들로 triacylglycerol 생합성과 동원에 관여하는 효소가 합성되지 않는다. 이들을 배양증식하여 콘플루언스 (confluence)가 되면 세포의 분화가 나타나고, 지질합성과 동원에 관련된 효소가 생성된다. 이때부터 지방세포대사에 영향을 미치는 호르몬과 반응

하며 계속해서 지질을 축적한다. 또한 세포골격단백질 합성능력을 상실하면서 동시에 fibroblast 모양으로부터 구형의 지방세포 모양으로 변한다 (Cryer, 1982). 세포주 (cell line)나 지방조직 유래의 adipoblast의 배양에 기초한 결론은 in vivo의 상태를 반영하지 않는다. 무흉선증의 마우스내로 세포주를 주입하면 전형적인 지방 다발이 발달한다. 지방조직의 stromovascular fraction으로부터 분리한 adipoblast의 기원도 불분명하다. 이들이 미분화된 전구세포 (precursor cells)인지 또는 탈분화 (또는 역분화) 지방세포인지 확실치 않기 때문이다.

연구의 목적 : 지방축적은 지방세포 (adipocyte)가 증식하거나 지방생합성이 증가하는 현상으로 어린 돼지에서는 지방세포의 증식이 많으나, 성장하면서 지방세포의 증식이 감소하고 간장과 지방세포에서 생합성된 지방이 지방세포에 축적된다. 본 연구에서는 지방세포의 증식과 지방조직의 triacylglycerols (fat)의 합성과 가수분해 (lipolysis)를 조절하면 지방축적을 조절할수 있다고 가정하였다.

지방세포를 인슐린과 함께 배양하면 지방의 합성이 촉진된다 (Ailhaud 등, 1990). Retinoic acid는 C/EBP β가 매개하는 전사(transcription)를 저해함으로서 지방생합성을 막는다 (Emily, 1996). Tumor Necrosis Factor-α는 지방세포 전구세포의 분화를 저해하고 새롭게 발달한 지방세포의 탈지방화를 일으킨다고 한다(Petruschke과 Hauner, 1993). 장쇄지방산 (long chain fatty acid)(C18:2)은 미분화 지방세포의 분화를 촉진한다고 한다 (Nada 등. 1991). 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 지방 생합성 인자인 포도당 (glucose)과 리놀산 (linoleic acid) 그리고 항지방생합성 인자인 retinoic acid, tumor necrosis factor-α, norepinephrine의 영향을 조사하였다. 또한 이들 처리에 의하여 분화유도된 지방세포 막단백질 (세포 용해물)을 이용하여 채란계에 면역하고 IgY를 생산하여 그 특이성과 이것들의 돼지 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

제3장. 材料 및 方法

1. 지방세포 전구세포의 분리 및 배양

가. 지방세포 전구세포의 분리

체중 15-25kg의 숫랜드레이스 (landrace) 지방조직을 콜라젠 분해효소(collagenase) 1 ㎎/mL (Kestin 등, 1993)가 함유된 세척배지(Medium 199)에서 가위로 세절하고 37℃에서 90분간 배양하고 원심하여 생긴 펠렛을 배양배지 (Plating media: medium 199 FBS 10%)로 현탁하고 세포수를 센후 각 플레이트에 나누어 37℃와 CO2 5%에서 24시간배양하였다.

나. 분화.

지방세포 전구세포의 분화유도(Henteges and Hausman,1989)는 배양배지에 Insulin (10 ug/mL), 3-Isobutyl-1- Methylxanthine (IBMX : 0.5 mM 그리고 Dexamethasone (0.25 μM)이 함유된 분화배지(Medium 199, Porcine serum 2.5%)로 분화를 유도하였다. 분화배지에 포도당 (Glucose), Retinoic acid, Norepinephrine, Tumor necrosis factor-α 또는 Linoleic acid가 각각 함유시 전구세포의 분화정도를 분화배지의 그것과 비교하였다.

분화정도는 분화세포수 와 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPDH: E.C.1.1.1.8)의 활성을 측정하여 인슐린이 함유되지 않은 대조배지(-Insulin)에서 배양한것의 분화정도와 비교하였다. 분화세포수는 현미경 (Olympus CK2, ULW CD 0.30, Japan, 400배)으로 배지를 여러 부분으로 나누어 세고, GPDH활성은 Ramsay 등(1987) NADH의 흡광도의 감소를 340 nm에서 측정하여 활성단위는 분당 NADH 1 umol의 산화량을 단백질 무게를 기준으로 계산하였다.

2. 돼지 지방세포 막단백질의 분리 및 정제

도축장에서 취한 돼지 복부지방조직을 37℃의 PBS(pH 7.4)에서 세척하고 지방조직만을 골라내어 잘게 세절하고 지방조직 10 g 당 지방세포막 추출액 (pH 7.4) (Butterwith 등, 1989) 15 mL의 비율로 균질화하여 지방세포 막단백질을 추출하였다. 추출액은 실온에서 500 × g로 10분간 원심하여 상층부 지방층과 맨 아래층의 펠렛을 제외한 중간층을 수집하였다. 중간층과 PBS는 1:1로 혼합하여 100,000 × g에서 1시간 원심하여 펠렛을 취하였다. 펠렛은 sucrose 32% gradient buffer (pH 7.4) 1.5 mL로 현탁액을 만들었다. 초원심관에 sucrose 40% gradient buffer를 넣고 그위에 같은양의 sucrose 32% gradient buffer를 조심스럽게 넣은 후 그위에 수집한 막단백질 (gradient buffer 32%)을 적용하고 (Kestin 등, 1993) 100,000 × g에서 1시간동안 원심하여 sucrose 32%층을 조심스럽게 취했다. sucrose 32%층과 PBS는 1:1로 혼합하여 100,000 × g에서 한시간 원심하여 얻어진 펠렛은 PBS에 현탁하여 단백질을 정량한후 1.5 mL씩 분주하여 -80℃에 보관하고 다음실험에 사용하였다.

3. 채란계의 면역, IgY의 분리 및 정제

가. 면역

1) 돼지 지방세포 전구세포의 면역

77주령의 ISA-brown 산란계 7마리에 106 개의 지방세포 전구세포와 Complete Freund's Adjuvant(CFA)로 조제된 유상액(emulsion)을 주사하여 자극하고 다음 2주

마다 2회 106개의 지방세포 전구세포와 Incomplete Freund's Adjuvant(IFA) 유상액을 같은 방법으로 주사하여 면역반응을 증강 (Boosting)시켰다.

2) 돼지 지방세포 막단백질의 면역

77주령 ISA-Brown 산란계에 돼지 지방세포 막단백질 PBS현탁액 동량의 CFA의 유상액을 (생물시료조제법①, 1986) 4차에 걸쳐서 2주에 한번씩 주사하였다. 두번째의 자극 (Boosting)부터는 지방세포 막단백질 PBS 현탁액과 IFA 유상액을 주입하였다. 항원을 주입하기 전에 채란계의 대조혈액을 취하여 4℃에서 3-4시간 방치한후 3000 rpm에서 10분 원심하여 분리한 혈청을 -80℃에 보관하였다.

나. IgY의 정제

난황은 난백과 분리하여 증류수로 난백을 씻고, 페이퍼타월 위에서 조심스럽게 굴리며 난백을 제거한 다음 난황막에 구멍을 뚫어 50 mL 원심튜브에 난황을 모았다. 난황은 동량의 증류수로 희석 교반한 후 난황체적 4배의 0.15% λ-carrageenan 용액으로 희석 교반하여 4℃에서 12시간 이상 정치하였다. 난황균질화액을 4,000 × g 에서 15분간 원심하여 얻은 상층액을 여지로 여과하고 포화 ammonium sulfate 용액을 침전이 생길때까지 넣고 4,000 × g 로 15분동안 원심하여 상등액은 버리고 펠렛을 취하여 난황량의 5배만큼의 PBS로 현탁시켰다. 펠렛 PBS 현탁액은 무수 sodium sulfate을 18% (W/V)가 되도록 넣고 완전히 녹을 때까지 수조에서 진탕한다음 4,000 × g 에서 15분간 원심하고 발생한 펠렛을 2배의 냉각 PBS로 용해하고, 멸균 0.45 uM filter로 여과하고 단백질함량을 측정하였다.

4. 항체의 반응성과 특이성

가. ELISA에 의한 항체의 반응성 평가

항혈청과 항체 (IgY)의 반응성은 직접 ELISA법으로 측정하였다. 돼지 지방세포 막단백질을 carbonate/bicarbonate 용액 (pH 9.8)에 현탁하여 96 well immunoplate에 0.25 ㎍/well씩 분배하고 지방세포 전구세포나 분화유도 세포는 10³개/wel씩 분배하였다. 면역플레이트는 4℃에서 하룻밤동안 또는 37℃에서 2시간 배양하고, PBST (pH 7.4)로 3회 세척한 다음 blocking buffer를 50 ㎕씩 분주하고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 계속해서 PBST로 1회 세척하고 2번 well부터 blocking buffer를 100 ㎕씩 분배하고 항혈청 (1차 항체) 또는 IgY를 순차적으로 희석하여 넣고 1시간 배양한 후 PBST로 세번 세척하였다. PBST로 1000배 희석한 anti-chicken IgG (whole molecule) - alkaline phosphatase conjugate (2차항체)를 50 ㎕씩 배분하고 1시간 배양한다음 PBST로 2번 세척하였다. 기질용액 (20 ㎎ P-Nitrophenyl phosphate / 20 mL glycine buffer) 50 ㎕/well을 넣고 10분간 방치한후 0.5 N NaOH용액 50 ㎕로 반

응을 정지시키고 microtiter reader (microplate autoreader EL 311, bio-tek instruments, U.S.A)로 405 nm에서 OD값을 측정하였다.

나. 전기영동, Immunoblotting 및 Immunohistochemistry

1)전기영동(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Two Mini Gel (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIO-RAD, America)의 seperating 부분과 stacking 부분에 젤을 고정하고 빈공간에 러닝버퍼 (Running buffer : Tris 6.06 g, Glycine 28.8 g, 10% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate 20 mL, H_2O 2 L)를 채우고 주사기로 거품을 제거하였다. 돼지 지방 막단백질 10, 20, 30㎍을 90-100℃에서 4-5분간 가열하여 단백질 분자와 SDS의 결합을 촉진시킨 후 stacking 부분에 로딩한 후 100V 전압에서 1시간 30분 통전하였다. 전기영동이 끝난 후 젤을 분리하여 염색용액(Commassie Blue R-250 0.025%, Methanol 40%, Acetic acid 7%, H_2O 2 L)으로 1시간 30분이상 밸리댄서로 흔들어주면서 담가두었다. 다시 탈염색용액 I (Acetic acid 400 mL, Methanol 70 mL, H_2O 1 L)로 30분씩 2번 탈염색하고 이어서 탈염색용액 II (Acetic acid 70 mL, Methanol 50 mL, H_2O 1 L)로 3시간 이상 세척하였다. 그다음 이미지 아날라이징 시스템 (Image Analysing system, BIO-PROFIL, 8617, France, 1998)으로 젤을 현상하여 단백질 패턴과 분자량을 확인하였다.

2)전기영동상중 단백질의 분자량 정량

단백질 표준품 (Biorad Prestained SDS-PAGE standards, Broad range, Cat. No. 161-0318)의 단백질 조성과 단백질의 이동거리를 용매의 총이동거리로 나눈 Retention factor(Rf) (X)과 단백질 분자량의 대수값 (Y)의 상관관계식을 이용하여 (Rosenberg, 1996) 전기영동상으로 분리된 단백질띠의 분자량을 예측하였다.

Immunoblotting (Westernblotting) : 전기영동이 끝나면 종이막, 솜 및 미리 준비한 젤 (Gel)과 동일한 크기의 membrane을 transfer buffer (tris 3.03 g, glycine 14.4 g, methanol 200 mL, H_2O 1 L)에 충분히 적셔두었다. 전기영동장치에 transfer membrane을 setting한후 membrane 위를 가볍게 스포이드로 rolling하여 100 V에서 2시간 통전하여 단백질을 전이 (transfer)하였다. membrane을 분리하여 panceau 용액 (panceau S (0.1%)/acetic acid (5%))에 담궈 염색하고 증류수로 가볍게 씻고 blocking buffer (5% sikn milk powder/TBST)로 10-20분 배양한뒤에 2.5% BSA/TBST 용액에 1000배 희석한 시험항체 (1차항체)로 2시간 반응시킨후 TBST로 10분씩 3번 세척하였다. peroxidase 결합 chicken IgY (2차항체)를 1% BSA/TBST 용액으로 2500배 희석하여 1시간 배양하고 TBST로 10분씩 3번 세척하였다. 암실에서 transfer membrane에 검출용액 (ECL Soln, western blotting detection reagents, amersham life science, england)을 뿌려준다음 1분 경과후 lap으로 싸서 형광을 관찰

하고 cassette (bio max MS intensifying screen, eastman kodak company, U.S.A)에 장착하여 필름을 감응시키고 auto developer로 필름을 현상하였다.

3) IgY-FITC 조제

FITC 1 vial에 2 mL 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer를 넣어 충분히 혼합한 20:1 FITC를 조제하였다. 이것을 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer로 2배, 4배 희석하여 10:1, 5:1의 FITC(Fluorescein isothiocyanate) 용액을 조제하였다. 호일로 싼 병에 freeze-dried 1.0 ㎎/mL의 IgY 0.2 mL를 넣었다. 20:1, 10:1, 5:1 FITC 용액을 50 ㎕ 넣고 빛을 완전히 차단하여 실온에서 2시간 흔들어주었다. G-25M Sephadex 칼럼을 12 mL의 PBS로 안정화시키고 0.25 mL의 FITC 부착 IgY 항체를 로딩한후 2.5 mL의 PBS를 흘려주었다. 처음 1.25 mL는 버리고 형광색이 나타나기 시작할 때 약 1 mL를 받아 실험에 사용하였다.

4) Immunohistochemistry

조직 또는 분화 세포를 실온 또는 4℃에서 80% aceton으로 5-10분간 고정하고 10분 동안 공기중에서 건조한 다음 PBST (PBS + Tween 80 3%)로 5분간 3회 세척하였다. 공기중에서 10분간 건조시키고 Daco Pen이나 머니큐어로 테두리를 만들고 빛에 노출되지 않도록 호일에 싼 IgY-FITC (IgY를 PBS로 10배 희석한 용액)를 이미 테두리를 만들어놓은 부위에 반응시키고 습식 배양기에서 45분간 배양하였다. PBS로 5분씩 3회 세척하고 가장자리를 휴지로 닦아낸 다음 mounting buffer (glycine buffer : glycine 0.42 g, sodium hydroxide 0.2 g, NaCl 0.51 g, sodium azide 0.03 g, glycerol 70 mL, 증류수 30 mL)로 반응시킨 다음 커버그라스로 덮어 현미경으로 관찰함과 동시에 사진을 촬영하였다.

제4절 結果 및 考察

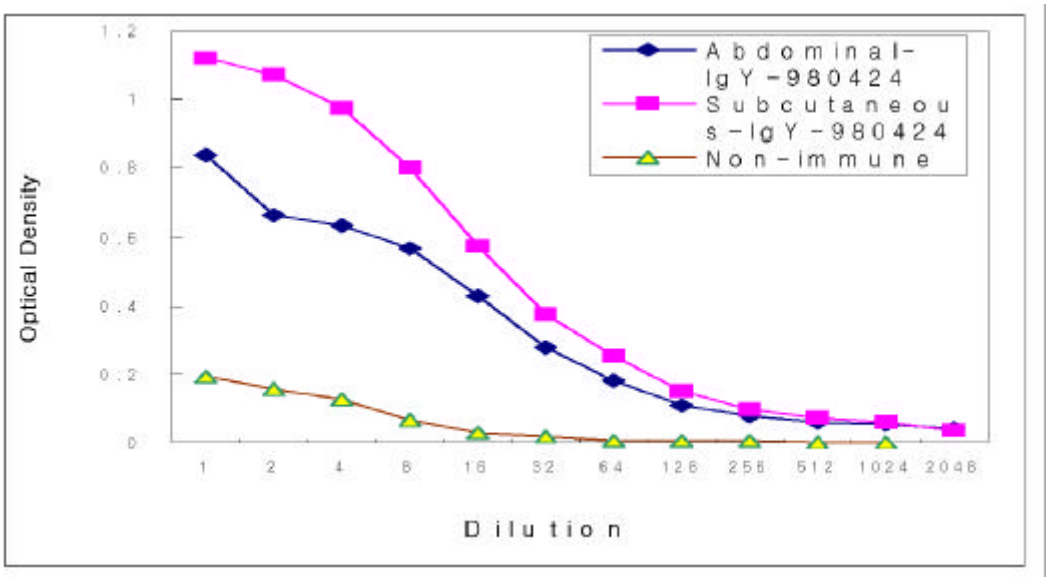
1. 항체(IgY)의 반응성

가. 항지방세포 전구세포-IgY 와 항지방세포 막단백질-IgY

복부, 피하 및 신장주변 지방조직 유래의 항지방세포 전구세포-IgY의 반응성은 그림 1에 나타낸바와 같이 대조구에 비해 16배의 희석배율에서 반응성을 보였다. 복부, 피하 및 신장주변 지방조직 사이에 항체의 반응성에 미치는 유의한 차는 없었다.

복부와 피하지방세포 막단백질에 대한 항혈청과 IgY(그림 2)는 2048배가 넘는 반

응성을 보이고 있다. 그림 2의 계란을 수집한 4일 뒤에 채취한 계란에서 정제된 항지방세포 막단백질-IgY의 반응성을그림 3에나타내었다. 항지방세포 전구세포-IgY(그림 1)에 비해서 항막단백질-IgY (그림 2와 3)의 반응성이 크게 높아졌다.



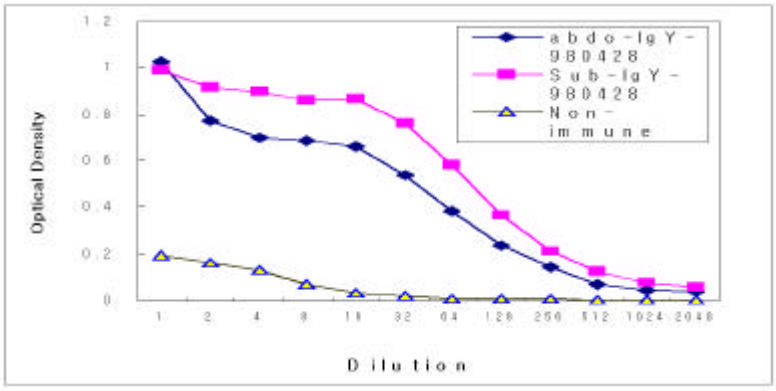


Figure 3. Reactivity of IgY raised against porcine adipocyte membrane proteins from abdominal and subcutaneous adipose tissues toward porcine adipocyte membrane proteins as determined by ELISA

본 연구에서 IgY의 반응성은 지방세포 전구세포를 항원으로 사용했을 때 16배, 분화된 지방전구세포의 세포용해물을 사용하면 512배 그리고 지방세포 막단백질을 항원으로 사용하면 2048배까지 반응성이 증가하였다. 이것은 막단백질 항원은 세포자체에

비하여 그만큼 항원의 특이성이 향상된다는 것을 나타낸다고 생각되었다. 이것은 항원결정기 (epitope)의 특이성이 향상되는 결과를 나타내는 것이라 생각된다.

가금에서는 토끼에 비해서 적은량의 항원을 주입해도 반응성이 높은 항체가 생산된다 (Goodman 등, 1951)는 것은 잘 알려져 있다. 본 연구성적은 이러한 결과를 뒷받침하는 것이다.

항원의 주입시간과 주입회수의 증가에 따라 반응성이 증가하고 있으나, 이것은 닭뿐만 아니라 오리 (Niggins, 1989)에서도 잘 연구되었으며 이들 성적과 일치하는 결과라고 생각된다.

한편 본 연구에서는 지방세포막 단백질을 추출한 지방조직의 종류가 생산된 IgY의 반응성에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내고 있다.

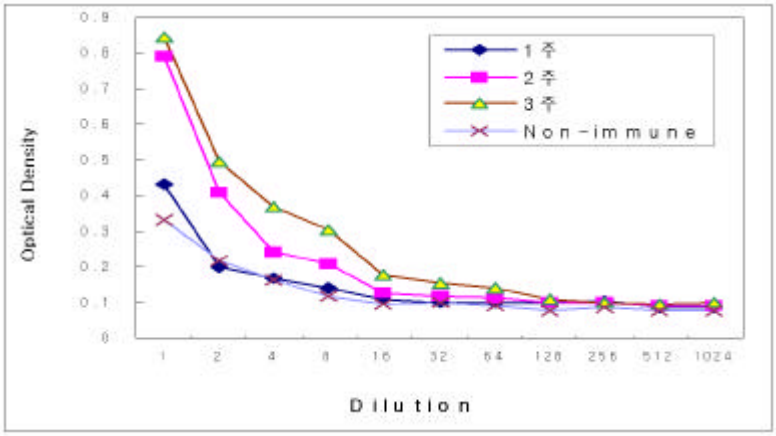


Figure 4. Reactivity of IgY for antiadipocyte precursor cell from the subcutaneous adipose tissue by ELISA 96 well plate coated with 103 adipocyte precursor cells per well

나. 항원주입후 경과시간과 항체의 반응성

항원주입후 경과시간이 항지방세포 전구세포 (IgY)의 반응성(그림 4)은 1주후는 2배, 2주후는 64배 그리고 3주후에는 약 512배로 희석해도 반응성이 존재하였다. 항원주입후 시간이 지남에 따라 항체의 반응성은 상승하여, 반응특이성이 증가하였다.

다. 항 분화 지방세포 전구세포-IgY의 반응성

1) 포도당 항체 (Glucose-IgY)

분화배지에 20 mM**의 포도당이 함유된 배지에서 분화된 피하지방조직의 지방세포 전구세포의 막단백질을 채란계에 주입하여 작성된 항체** (Glucose-IgY)**의 반응성(그림** 5)**은** 512**배 이상 희석해도 항원과의 반응성을 보이고 있다. 이 값은 그림** 1**의 항지방세포 전구세포-**IgY**에 비해서는 높으나, 그림** 2**의 항지방세포 전구세포 막단백질-**IgY **비해서는 낮은 값이다.**

2). **리놀산 항체** (C18:2-IgY)

분화배지에 2 μM**의 리놀산** (C18:2)**존재하에서 분화된 피하지방조직의 지방세포 전구세포의 막단백질에 대한 채란계의 항체** (C18:2-IgY)**의 반응성(그림** 6)**은** Glucose-IgY(**포도당 항체)와 같은** 512**배의 희석농도에서 반응성이 있었다.**

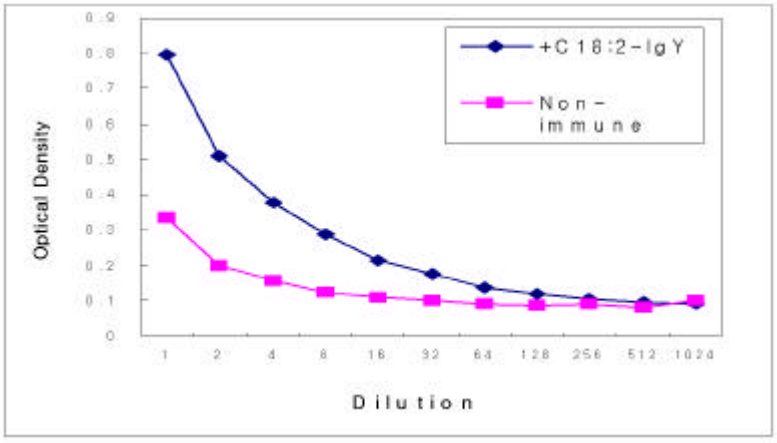


Figure 6. Reactivity of C18:2-IgY for the antisubcutaneous stromal vascular cells differentiated with linoleic acids (2μM) into the same cells

3). **비타민** A**산** (Retinoic acid ; RA) **항체** (RA-IgY)

분화배지에 2 μM**의** RA **존재하에서 분화된 피하지방세포 전구세포의 막단백질에 대한 채란계 항체(**RA-IgY)**의 반응성(그림** 7)**은** 512**배의 희석농도에서 반응성이 있었으며,** Glucose-IgY (**그림** 5) **및** C18:2-IgY (**그림** 6)**의 반응성과 같았다.**

4). Tumor necrosis factor (TNF)-α-IgY (TNF-α-IgY)

분화배지에 2 ng/mL의 TNF-alpha 존재하에서 분화된 피하지방세포 전구세포의 막단백질에 대한 채란계 항체 (TNF-α-IgY)의 반응성(그림 8)도 512배의 희석농도에서 반응성이 있었으며, Glucose-IgY (그림 5) 및 C18:2-IgY (그림 6) 및 의 RA-IgY 반응성과 같았다.

분화유도시 첨가된 지방생합성 촉진 또는 억제제는 항체의 반응성에 영향을 미치지 않았다. 이것은 이러한 물질들의 항원결정기 (epitope)의 수에는 영향을 미치지 않았다는 것을 나타낸다. 이러한 물질을 첨가한 이유는 항체의 반응성보다도 분화시 생성되는 단백질 밴드에 영향을 미칠 것이라고 생각되어 첨가되었으나, 단백질 밴드를 확인하는 실험이 조직적으로 이루어지지는 않았다.

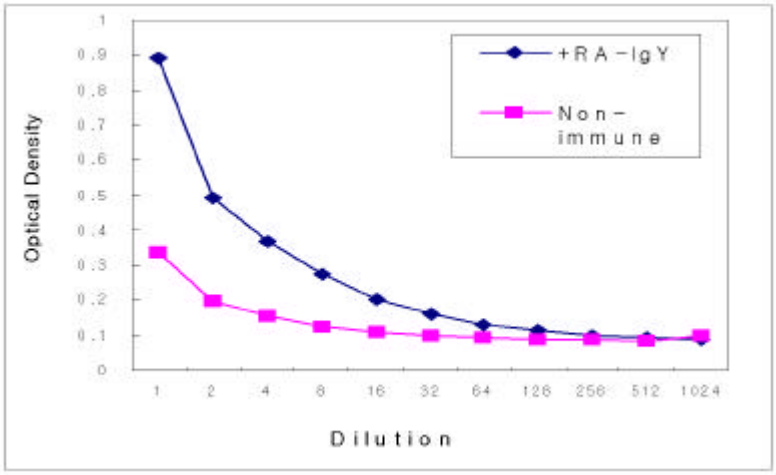


Figure 7. Reactivity of RA-IgY for the antisubcutaneous stromal vascular cells differentiated with retinoic acids (2μM)

라. IgY 생산조건

본 연구에서 IgY를 생산하기 위한 조건에 따른 IgY의 반응성에 관해서 설명한 내용을 Table 2에 정리하였다. IgY의 생산은 혈액채취가 필요없고 IgY의 정제가 간단하기 때문에 polyclonal 항체를 만들기 위한 효율이 높은 경제적인 방법이다 (Akita과 Nakai, 1992). IgY의 반응성을 제 21차 유럽대체방법에 관한 워크숍 (The 21st European workshop on Alternative Methods) (Shade 등, 1996)에서 추천한 프로토콜에 의하면 Adjuvant는 Freund's Incomplete adjuvant, Specol, Lipopeptide (250 μg)이다. 본 연구에서는 Freund's Complete adjuvant와 항원의 에멀젼을 주입하여 자극하고, Boosting은 Freund's Incomplete adjuvant를 사용하였다. 면역에 사용한 Adjuvant가 생산된 IgY의 반응성에 영향을 미치는지에 대해서는 검토되지 않았다. 항체 사용

량도 10-100 μg을 추천하고 있으나, 본 실험에서는 250 μg의 단백질을 사용하였으며,

Table 2. Reactivity of IgY studied

Antibody	Antigen	Stimul-ation	Boost-ing	Week after immun-ization	Reactivity(ELISA) Antigen /Well	Antibody Dilution rate	Antibody ng/Well
IgY	Precursor cell	106	106	6	103	16	12500
Antiserum	Membrane protein	250μg	250μg	3	0.5μg	2048	98
IgY	Membrane protein	250μg	250μg	3	0.5μg	2048	98
Glucose-IgY	Lysate protein	250μg	250μg	3	0.5μg	512	391
C1282-IgY	Lysate protein	250μg	250μg	3	0.5μg	512	391
Ra-IgY	Lysate protein	250μg	250μg	3	0.5μg	512	391
TNF-α-IgY	Lysate protein	250μg	250μg	3	0.5μg	512	391

주입위치도 Shade 등 (1996)은 성계에서는 피하주사를 권장하고 있으나, 본 연구에서는 주로 흉근의 근육에 주사하였다. 한편 면역간격도 4-8주를 두고서 2-3회 주입할 것을 권장하고 있으나, 본 연구에서는 2주 간격으로 3회까지 주입하였다. 이러한 점을 고려하여 적은 노력으로 계속적인 IgY 생산을 위한 프로토콜을 만드는 것이 필요하다고 생각한다. 한편 Table 2에서 알 수 있는 바와 같이 항원의 특이성이 향상되어야 IgY의 반응성도 증가하므로 항원의 특이성을 증진시키기 위한 연구가 필요하다고 생각된다.

2. 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 분화촉진 및 억제제의 영향

가. 인슐린 과 포도당

인슐린(10 μg/mL)이 함유된 지방세포 전구세포의 분화배지에 20 mM의 포도당, 20 μM의 리놀산, 2 μM의 Retinoic acid, 2 ng/mL의 TNF-α 및 1 μM의 노르에프네프린이 각각 함유되었을때의 분화세포수와 GPDH 활성을 Table 3에 나타내었다.

분화된 세포수와 GPDH 활성은 인슐린이 첨가되지 않았을 때에 비해서 인슐린이 첨가되면 유의하게 높아졌다. Ailhaud 등(1990)은 지방세포 전구세포를 인슐린으로 분화유도시 GPDH의 활성은 인슐린이 첨가되지 않았을때에 비해서 높다고 하여 본 연구성적과 일치하였다. 인슐린은 C/EBP-α를 탈인하여 활성화하고 (MacDougald 등, 1995), C/EBP-α의 발현이 유지되므로서 마지막 지방세포 분화를 유지한다 (Edmonson 등, 1992)고 한 보고와 일치하는 성적이라 생각되었다.

본 연구에서 지방세포 전구세포의 분화배지에 20 mM의 포도당이 함유되면 인슐린으로 분화유도시에 비해서 세포수는 유의하게 ($P < .05$) 많았으나 GPDH 활성은 감소하는 경향을 보였다. 포도당의 농도가 세포수와 GPDH 활성에 미치는 영향은 본 연구에서는 조사되지 않았다. 따라서 GPDH 활성이 낮아지는 것이 포도당의 농도에 의한 독성을 나타내는 것인지에 대한 고찰이 불가능하였다.

Table 3. The differentiation of adipocyte precursor cells to adipocyte in the medium containing adipogenic or anti-adipogenic substances

Factor	Treatment	Cell Number	GPDH activity
		Number/plate	NADHnmol/mg/min
Basal	None	1.6±1.0c(25)	66.3±5.2b(2)
Control	Insulin	84.7±12.7b(25)	242.7±28.3a(2)
Adipogenic	Glucose	118.9±13.1a(25)	188.2±14.6a(2)
	Linoleic acid	102.7±9.5b(25)	193.5±2.1a(2)
Anti-	Retinoic acid	57.1±9.7b(25)	192.2±49.7a(2)
adipogenic	TNF-α	68.3±11.3a(25)	107.4±18.7b(2)
Norepinephrine		62.8±11.2b(25)	164.6±2.1b(2)

Values are the mean±SD of replication. Figures in parenthesis indicates the number of replication.

Adipocyte precursor Cells proliferated to reach confluence in media with 10% fetal calf serum and then incubated with the media containing 2.5%porcine serum,0.25 mM dexamethasone, 0.5 mM3-isobutyl-1-methylxanthine and 10μg/mL insulin for 7 days with or without 20 mM glucose,20 *u*M linoleic acid, 2 *u*M retinoic acid, 2 ng/mL tumor necrosis factor alpha and 1 *u*M norepinephrine, respectively. The differentiated cells were counted randomly at 25 spots in the microscope and GPDH activities were assayed in the cells harvested.

a~c:Mean with a column with no common superscript differ significantly at $p<.05$

나. 리놀산

지방세포 전구세포를 인슐린으로 분화를 유도할 때 20 μM의 리놀산(linoleic acid)이 함유되도록 하면 분화세포수는 인슐린으로 분화유도시에 비해서 높아지는 경향이 있었고, GPDH 활성은 낮아지는 경향을 나타내었다. 지방산 (Nada 등, 1991)과 리놀산 (Amri 등, 1991)이 지방세포 전구세포의 분화를 촉진한다고 하였다. 이는 지방산이 지방세포 전구세포의 분화에 필요한 단백질의 유기를 조절하거나 촉진하기 때문이라고 하였다. 본 실험결과는 분화된 세포수는 배지에 20 μM의 리놀산이 함유되면 인슐린으로 분화유도시에 비해서 유의하게 많은 세포수를 보여 Nada 등 (1991)의 실험결과와 일치한다고 생각되었다. 최근에 3T3-L1 전구지방 세포주의 분화중에 지방산 수송단백질 (FATP) 유전자의 발현이 인슐린과 장쇄지방산에 의하여 증가한다 (Man 등, 1996)는 보고가 발표되었다. 분화배지중의 리놀산은 FATP의 발현을 증가시키므로서 분화세포수를 증가시키는 원인이 될지도 모른다. 그러나 GPDH의 활성은 인슐린으로 분화유도시에 리놀산이 함유되거나 되지않은 배지사이에 유의차가 나타나지 않았다.

다. 비타민 A (Retinoic acid)

인슐린으로 분화유도시 2 μM의 retinoic acid가 함유되면 분화된 세포수는 인슐린으로 분화유도시에 비해서 유의하게 낮았으나 GPDH 활성은 인슐린으로 분화유도시와 2 μM의 Retinoic acid가 함유된 것 사이에 유의차가 보이지 않았다. 분화세포수가 낮아지는 것은 지방세포 전구세포의 분화가 Retinoic acid에 의해서 억제되고 있다는 것을 나타내는 것으로 Retinoic acid가 지방세포의 분화를 저해한다는 보고 (Pairault 등 1987, Xue 등 1996, Suryawan 등 1997)와 일치하는 결과일 것이다. GPDH의 활성이 유의하게 낮아지지 않는 것은 GPDH 활성의 측정회수가 적은 것을 뜻하는지, 분화는 억제하나 지방생합성은 억제하지 않는다는 것을 의미하는지 알 수 없었다. 그러나 3T3-F442A 전구 지방 세포주에서 RA는 glycerol-3-phosphate dehydragenase (GPD) Gene의 전사 (transcription) 및 mRNA GPD의 양을 75% 억제한다는 보고도 있으므로, 측정횟수를 증가하여 RA가 GPDH 활성에 미치는 영향을 확인할 필요가 있을 것이다. .

라. TNF-α

TNF-α가 2 ng/mL의 농도로 인슐린 분화배지에 첨가되면, 분화세포수 및 GPDH활성 모두 인슐린 분화유도시에 비해서 유의하게 ($P < .05$) 낮은값을 나타내었다. Th-Ptruschke 등 (1993)의 실험에 의하면 사람 지방세포 전구세포에서 지방세포

수와 GPDH 활성이 TNF-α를 첨가했을 때 농도와 분화시간에 따라 감소한다고 하였다. Reid 등 (1989), Zhang 등 (1996) 및 Torti 등 (1989)도 세포수와 GPDH 활성이 TNF-α의 첨가에 의하여 낮아진다는 것을 발표하고 있다. 이들 연구성적들과 본 연구는 일치한다고 생각되었다.

마. 노르에프네프린

인슐린으로 분화를 유도할때 분화배지에 첨가된 1 μM의 Norepinephrine은 지방전구세포의 분화세포수 및 GPDH 활성 모두 인슐린으로 분화유도시에 비해서 유의하게 낮았다. 노르에피네프린은 쥐의 Brown adipose tissue (BAT)의 증생(Hyperplasia)을 유도하는 교감 (sympathetic)신경에서 분비되는 호르몬이다 (Geloem과 Collet, 1992). BAT에서는 전구세포의 분화를 포함한 GPDH mRNA의 발현을 증가시킨다 (Barroso 등, 1996). 본 연구에 사용된 지방세포 전구세포는 BAT유래가 아니나 분화세포수가 감소하는 것은 노르에피네프린이 pre-adipocyte의 증식을 억제한다 (Jones 등, 1992)는 보고와 일치하는 성적인 것 같다. 한편 본 연구에서 GPDH의 활성이 낮아지는 것이 BAT와 White adipose tissue의 차이인지에 대한 검토를 위한 실험은 진행되지 않았다.

3. 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 항체 (IgY)의 영향

Table 4에는 지방세포 전구세포를 인슐린으로 분화유도할 때 20 mM의 포도당 (Glucose-IgY), 20 μM linoleic acid (C18:2-IgY), 2 μM retinoic acid (RA-IgY), 2 ng/mL tumor necrosis factor-alpha (TNF-α-IgY) 및 1 μM norepinephrine (NE-IgY)를 각각 첨가하여 분화유도된 세포 용해물(lysate)을 산란계에 각각 면역시켜 얻은 항체의 영향을 나타내었다.

Glucose-IgY (5 ng/mL)는 유의하게 ($P<.05$) 분화세포수를 증가시켰으나 GPDH 활성은 감소시켰다. 인슐린으로 분화유도하는 배지에 20 mM의 포도당이 첨가되었을 때 (Table 3)와 유사한 경향을 나타내었다.

C18:2-IgY가 분화배지에 5 μg/mL의 농도로 함유되면 분화된 세포수와 GPDH 활성은 분화배지에 비해서 유의하게 감소되었다. 지방세포 전구세포의 분화배지에 Linoleic acid존재하에서 (Table 3) 분화세포수는 증가하는 경향이 그리고 GPDH 활성은 낮아지는 경향이 있었다. 그러나 C18:2-IgY는 지방세포의 분화를 억제하여 Glucose-IgY의 분화세포수와 GPDH 활성에 미치는 영향과 달랐다.

TNF-α-IgY는 5 μg/mL농도로 분화배지에 첨가되면 지방세포 전구세포의 분화세포수와 GPDH 활성을 유의하게 낮추어서 C18:2-IgY의 지방세포 전구세포의 분화에 미

치는 영향과 유사하였다.

NE-IgY 5 μg/mL가 분화배지에 함유되면 분화세포수가 유의하게 감소하였다. NE-IgY가 GPDH 활성에 미치는 영향은 cell 배양도중 오염과 GPDH 활성 측정시 부주의로 인하여 측정하지 못하였다.

RA-IgY가 분화배지에 함유되면 분화세포수와 GPDH 활성을 유의하게 감소시켰다.

Table 4. Effect of Anti-differentiated cell by adipogenic or anti-adipogenic substances IgY on the differentiation of adipocyte precusor cells

Factor	Treatment	Cell Number	GPDH activity
		Number/plate	NADHnmol/mg/min
Basal	None	0.8±0.81(10)	224.4±71.3c(2)
Control	Insulin	88.5±7.1b(6)	532.3±78.3a(3)
Antibody	Glucose-IgY	97.6±6.2a(10)	281.1±26.7c(2)
	C18:2-IgY	71.5±7.1c(10)	172.7±11.8c(2)
	RA-IgY	53.4±5.5e(10)	374.9±10.8b(2)
	TNF-α-IgY	66.0±7.4d(10)	268.4±19.1c(2)
	NE-IgY	73.6±9.5c(8)	----

Values are mean±SD of replication. Figures in parenthesis indicates replication.
Adipocyte precursor cells proliferated to reach confluence in media with 10% fetal calf serum and incubated with the media containing 2.5%porcine serum, 0.25 mM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin and 10 μg/mL insulin for 7 days with or without 5 μg/mL glucose-IgY, 5 μg/mL C18:2-IgY, 5 μg/mL (TNF-α)-IgY, 5μg/mL NE-IgY, 5 μg/mL RA-IgY. IgY against differentiated cells in the media containing 20 tumor necrosis factor (TNF)-α and 1 μM norepinephrine (NE) was raised in hen. the differentiated cells were counted randomly at 25 spots in the microscope and GPDH activities were assayed after the cells were harvested
a~f:Mean with a column with no common superscript differ significantly at $p < .05$

이상과 같이 지방세포 전구세포의 분화배지에 항체(IgY)가 첨가되면 지방세포의 분화가 감소하였다. 여러가지 IgY 사이에서 분화세포수에 미치는 영향은

Glucose-IgY는 오히려 증가시켰으나, NE-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY 순으로 점점 많이 감소시켰다. GPDH 활성은 RA-IgY, Glucose-IgY, TNF-α-IgY 및 C18:2-IgY 순으로 점점 많이 활성을 억제시켰다.

이와같이 본 실험에서 연구된 IgY의 종류에 따른 분화세포수와 GPDH 활성에 미치는 Glucose-IgY 이외의 다른 IgY는 모두 비슷한 작용을 나타내었다. 본 연구에서 그 원인은 설명되지 않았다.

Pillion과 Czech (1978)는 쥐의 지방세포 막단백질에 대한 항체가 in vitro에서 지방세포의 포도당 산화를 증가시키므로서 인슐린과 비슷한 작용을 한다는 것을 관찰하고 있다. 한편 Frint 등 (1986)은 쥐의 지방세포 막단백질에 대한 양 (sheep)의 항체가 in vitro에서 낮은 농도에서는 포도당의 이용성을 증가시키나, 높은 농도에서는 지방세포를 감소시키는 작용이 있다고 하였다. 본 연구에서 Glucose-IgY 5 μg/mL의 농도에서 분화된 지방세포 수를 증가시키는 것은 포도당의 이용성이 증가한 결과를 나타내는 것일런지도 모른다. 이것은 Pillon과 Czech (1978)가 보고한 바와 같이 5 μg/mL의 Glucose-IgY는 지방세포 전구세포 분화시에 인슐린 비슷한 작용을 하고 있다는 것을 나타내고 있는지도 모른다. 그러나 같은 농도에서 C18:2-IgY, TNF-α-IgY, RA-IgY는 지방세포의 분화를 억제하는 작용을 하였다. 이것은 Kestin 등 (1993)의 in vivo에서 돼지의 지방세포막 단백질에 대한 양의 항체가 지방축적을 감소시키는 작용과 유사한 결과일런지도 모른다. 왜냐하면 Kim 등 (1999)은 항 3T3L-1 전구지방 세포주 IgY를 Freund's Incomplete adjuvant와 함께 에멀젼을 만들어 주입하면 번식기관 주위의 지방축적량이 감소한다는 것과도 비슷한 결과라고 생각되기 때문이다. 조류의 항체인 IgY가 포유류인 마우스의 지방축적을 감소시키는 성적과 본 연구의 in vitro 성적은 유사한 성적이라고 생각된다. 따라서 상기 Kestin 등 (1993)의 성적과 본 연구의 IgY가 지방세포 전구세포의 분화감소에 미치는 영향은 유사한 결과를 나타내는 것이라 생각된다.

본 연구에서 항체작용 메카니즘은 연구되지 않았으나, 지방세포 전구세포의 분화시에 항체의 활성화를 위한 보체 (complement)를 첨가하는 대신 보체가 살아있는 돼지의 혈청 (porcine serum)을 만들어서 사용했다. 따라서 본 연구성적은 보체활성에 의한 일반적인 항체작용 경로에 의한 지방세포가 용해된 결과일런지도 모른다 (Futter 등, 1992). 그러나 Kestin 등 (1993)은 항체의 작용이 림파구의 침윤에 의한 세포성 면역에 의할 것이라는 고찰을 하고 있다. 산업화를 위해서는 IgY의 작용 메커니즘에 관한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

4. 분화항체의 조직과의 반응특이성

가. 피하지방조직 지방세포 전구 (S-V세포)와 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY의 반응

사진 1은 피하지방조직 지방세포 전구세포 (S-V세포)를 커버그래스를 깐 6 well에서 배양한 후 아세톤 고정하고, 커버그래스에서 증식된 S-V 세포와 FITC를 부착시킨 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY와 반응시킨 것의 400배율에서의 형광사진을 찍은 것이다. 모든 사진에서 형광을 나타내어 지방세포 전구세포와 모든항체가 반응하고 있는 것을 알 수 있다. 이것은 지방세포 분화시에 지방생합성 촉진제 또는 억제제의 종류와 관계없이 만들어진 항체는 모두 지방세포 전구세포와 반응할 것이라는 것을 나타내고 있다.

나. 신장조직과 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY의 반응

사진 2는 신장조직 동결절편 아세톤 고정조직과 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY와 반응시켜 찍은 것이다. 지방세포 전구세포에서 보였던 것같은 뚜렷한 형광반응은 나타나지 않았다. 만들어진 항체들이 신장조직과 반응성이 약하다는 것을 나타내고 있다.

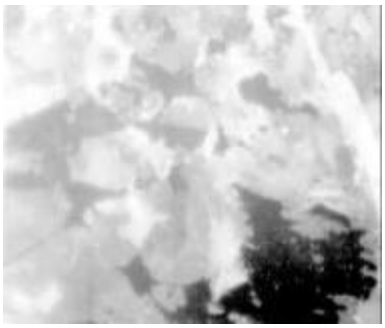
다. 간장조직과 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY의 반응

사진 3은 간장조직 동결절편 아세톤 고정조직과 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY와 반응시킨 것이다. 간조직에서도 지방세포 전구세포와 같은 뚜렷한 FITC의 형광반응이 관찰되지 않았다. 신장조직과 마찬가지로 간장조직에서도 분화항체와 반응성이 약하다는 것을 나타내었다.

지방세포 원형질막에 대한 항혈청 (antisera)은 세포표면 항원이 존재하고 in vitro에서 지방세포 분화중에 양적으로 증가한다. Wright와 Hausman (1990)은 마우스의 Myeloma 세포와 돼지 지방세포 막단백질로 면역한 마우스의 림파절 세포를 융합하여 만든 두 개 단클론 (mono clone) 항체가 성숙한 돼지 지방세포, stromal vascular, 피하지방조직, 지방조직내 근육과도 반응하여, 지방생합성 세포들은 지방세포에만 독특하지 않은 표면항체를 가진다고 결론을 내리고 있다. 본 연구에서 Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY 및 RA-IgY 모두 지방세포 전구세포와 명료하게 반응하므로서 Wright와 Hausman (1990)의 성적과 일치하고 있다고 생각되었다. 그러나, 신장조직 및 간장조직과도 약하지만 반응하고 있다는 것을 나타내어, 반응하

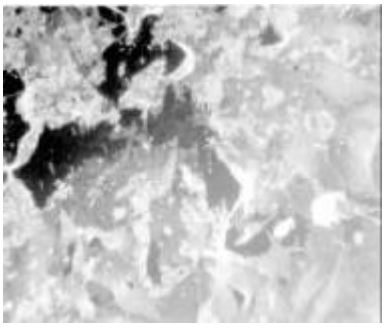
지 않는다는 설명은 불가능하므로 그 조직특이성을 정확히 확인하지 못했다. 그러나 Kestin 등 (1993)은 정제된 돼지 지방세포 막단백질에 대한 양의 항혈청은 Immunoblotting에 의하여 근육, 신장, 간장, 폐, 뇌, 비장 및 적혈구의 혈청 막단백질과는 반응성이 낮았으나, 지방세포막 단백질과는 강하게 반응했다는 것을 발표하고 있다. 본 실험은 IgY를 사용하였고 Kestin 등은 정제된 포유류 항혈청을 사용했다는 차이점은 있으나 그 원인에 대하여 본 연구에서 검사하지 못했다. 그러나 본 연구는 지방세포 전구세포의 반응성과 일치하는 결과로서 가금 IgY가 포유류의 지방세포와 반응하고 있다는 것을 나타내고 있다.

Glucose-IgY



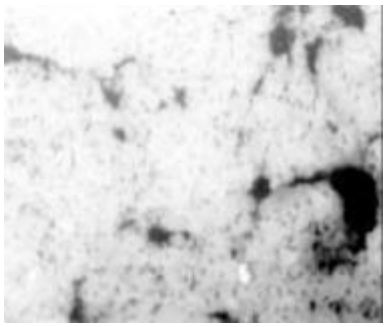
C18:2-IgY

TNF-α-IgY

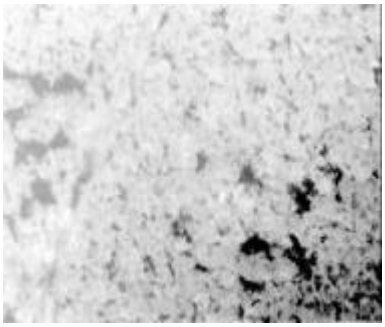


RA-IgY

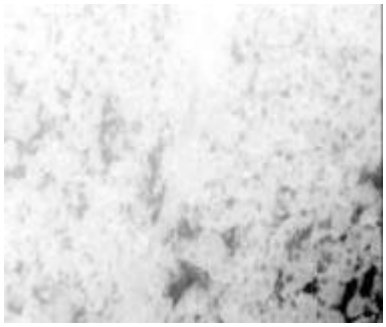
Photo 1. Fluorescence microscopy (×400) of the subcutaneous adipocyte precursor cells reacted with the Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNFα-IgY and RA-IgY attached FITC, respectively.



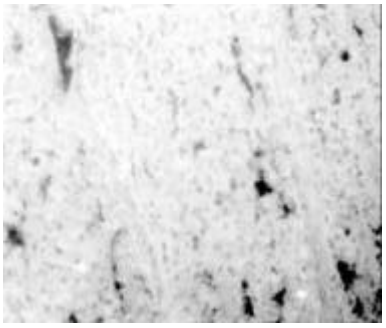
Glucose-IgY



C18:2-IgY

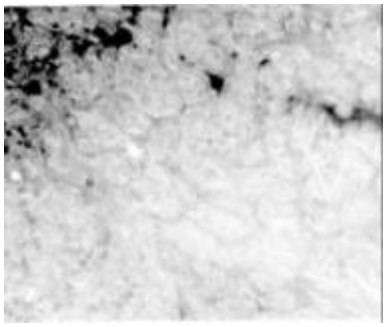


TNF-α-IgY

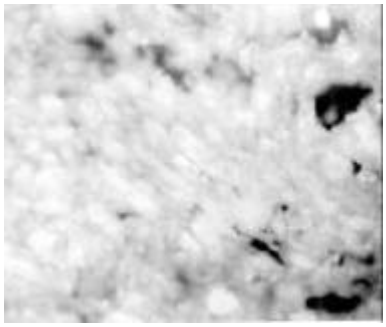


RA-IgY

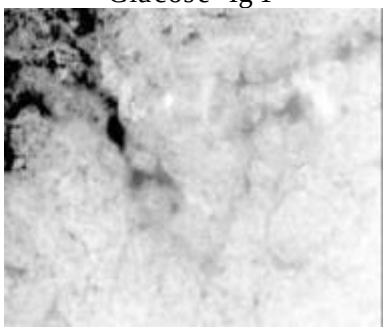
Photo 2. Fluorescence microscopy (×400) of the kidney tissue treacted with the Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY and RA-IgY attached FITC, respectively



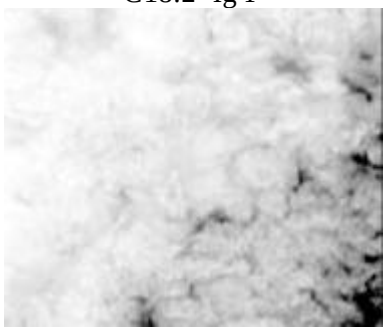
Glucose-IgY



C18:2-IgY



TNF-α-IgY



RA-IgY

Photo 3. Fluorescence microscopy (×400) of liver tissue reacted with the Glucose-IgY, C18:2-IgY, TNF-α-IgY and RA-IgY attached FITC, respectively

5. 지방세포 전구세포의 분화촉진 및 억제물질이 전기영동상에 미치는 영향

가. 분화유도된 지방세포 전구세포의 세포용해액

지방세포 전구세포의 분화를 인슐린으로 유도할 때 (+INS), 아무 처리를 하지 않은 5 μg/mL의 지방세포 전구세포 항체 (+AB:IgY), 2 ng/mL의 tumor necrosis factor alpha (+TNF-α) 또는 1 μM의 Norepinephrine (+NE)를 각각 첨가하여 분화유도 8일째에 세포용해액 (lysate)을 조제하여 SDS-PAGE법으로 전기영동하여 단백질을 분리한후 coomassi blue로 염색한 전기영동상을 figure 9에 나타내었다. 약 50 kDa 단백질 밴드가 TNF-α 또는 NE가 함유된 분화유도 지방세포 전구세포의 세포용액에서 다른 처리구와 비교하여 더 진해지는 경향을 보였다. 이것이 TNF-α와 NE의 작용에 의한 것인지 또는 지방세포 전구세포의 분화와 관계있는 단백질인지에 대한 검토는 이루어지지 않았다.

나. 분화된 지방세포 전구세포의 세포용해액 IgY 항체의 전기영동상

지방세포 전구세포에 인슐린이 첨가되지 않거나 (-INS), 10 μg/mL의 인슐린 (+INS), 20 mM의 포도당 (+GLU), 2 μM의 Retinoic acid (+RA), 2 ng/mL의 tumor necrosis factor-alpha (+TNF-α), 20 μM의 Linoleic acid (+C18:2)를 첨가하여 배양시킨 지방세포 전구세포를 산란계에 면역시켜 얻은 IgY항체의 전기영동상을 figure 10에 나타내었다.

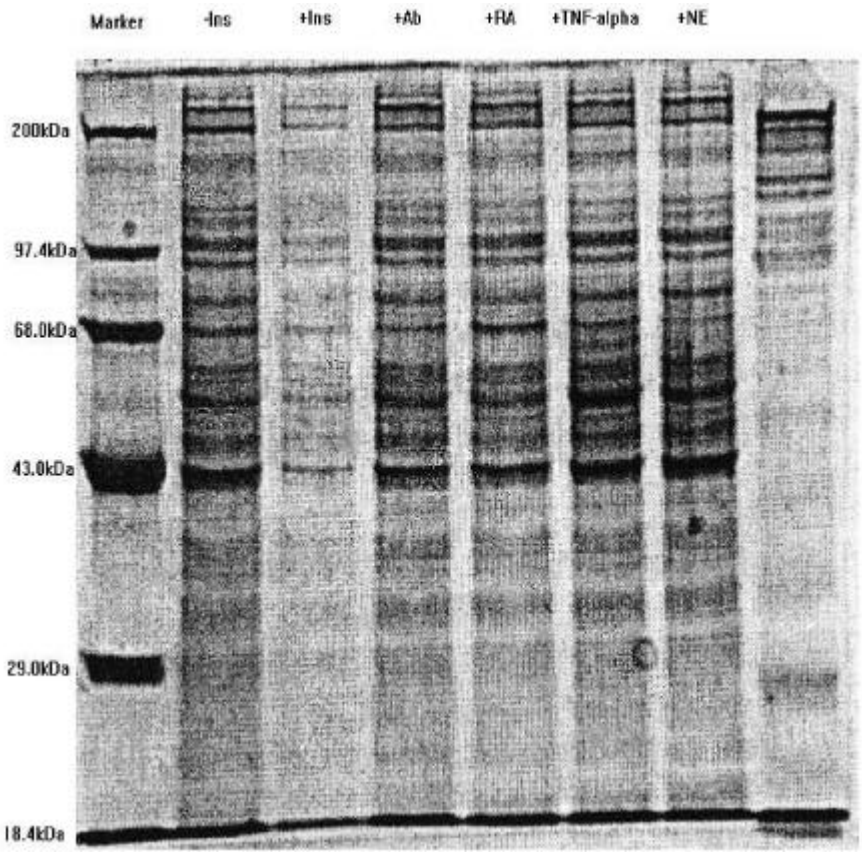


Figure 9. Electrophoretically saparated protein pattern of subcutaneous adipocyte precursor cell incbuated with Insulin, Antibody (IgY), Retinoic acid, TNF-α and Norepinephrine

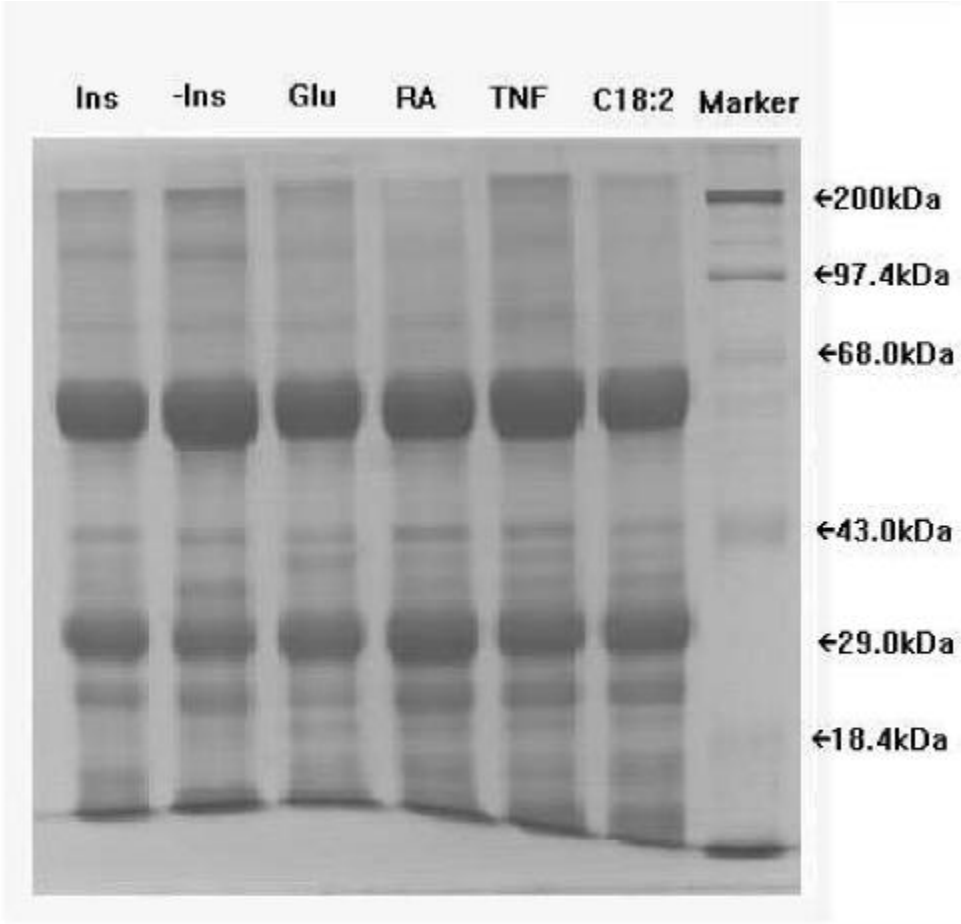


Figure 10. Electrophoretic patterns of Glucose-IgY, RA-IgY, TNF-α-IgY and C18:2-IgY raised against subcutaneous adipocyte precursor cells differentiated with the Glucose, Retinoic acid, TNF-α and C18:2, respectively

제5절 參 考 文 獻

Ailhaud, G. 1990. Extracellular factors, signalling pathways and differentiation of adipose precursor cells. Curr. Opin. Cell Biol. 2:1043-49

Amri, E., Ailhaud, G., Grimaldi, P. 1991. Regulation of adipose cell differentiation. Ⅱ. Kinetics of induction of the aP2 gene by fatty acid and modulation by dexamethasone. J. Lipid Res. 32:1457-63

Baile, C. A., McLaughlin, C. L. Buonomo, F. C., Lauterio, T. J., Marson, L. and DellaFerra. M. A. 1987. Opioid peptides and the control of feeding in sheep. Fed. Proc. 46:173

Barroso, I., Benito, B., Garci-Jimenez, C., Hernandez, A., Obregon, M. J., Santisteban, P. Norepinephrine tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during brown adipocyte differentiation. Eur J Endocrinol. 1999 Aug;141(2):169-179

Baumgardt, B. R. and peterson, A. D. 1971. Regulation of food intake in ruminants. 8. Caloric density of diets for young growing lambs. J. Anim. Sci. 54: 1191.

Butterwith, S. C., Kestin, S. C. Griffin, H. D. and Flint. D. J. 1989. Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors: Lack of tissue specifieity. Br. Poult. Sci. 30:371-378

Butterwith, S., Rhind, S. and Flint, D. Decreased Fat Content and Increased Lean in Pigs Treated with Antibodies to Adipocyte Plasma Membrane. J. Anim. Sci. 1993. 71:1486-1494

Cryer, A. 1982. In Biochemical Development of the Fetus and Neonate, (C. T. Jones, Ed.), P. 731-757. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press

Drewry, M. M. 1986. Developmental changes in response to overfeeding. M. S. Thesis. Univ. of Georgia, Athens.

Emily J. S., Mauricio, J. R, Dalei S., Samuel L, K, and Mitchell, A, L. 1996. Retinoic Acid Blocks Adipogenesis by Inhibiting C/EBPβ-Mediated Transcription. Molecular and cellular biology, Mar. 1997. p. 1552-1561

Forbes, J. M. 1985. Similarities and differences between intake control mechanisms in pigs, chickens and ruminants. Proc. Nutr. Soc. 44:331

Frint, D. J., Coggrave, C. E., Futter, M. J., Gardner. and Clarke, T. J. 1986. Stimulatory and cytotoxic effects of an antiserum to adipocyte plasma membrane

on adipose tissue metabolism in vitro and in vivo

Futter, C. E., Pauton, D., Kestin, S. and Flint, J. 1992. Mechanism of action of cytotoxic antibodies to adipocytes on adipose tissue, liver and food intake in the rat. International Journal of obesity 6:615-622

Goodman, M., Wolfe, H. R. and Nortan, S. 1951. Precipitin production in chickens. VI. The effect of varying concentrations of NaCl on precipitate formation. Journal of Immunology 66:225-236

Henteges,E.J. and G.J.Hausman,1989.Primary cultures of stromal- vascular cells from pig adipose tissue. The influence of glucocorticoids and insulin as inducers of adipocyte differentiation. Domest. Anim. Endocrinol. 6(3).275.

Houpt, T. R. 1985. The physiological determinants of meal size in pigs, Proc. Nutr. Soc. 44:323.

Jones, D. D., Ramsay, T. G., Hausman, G. J., Martin, R. J. 1992. Department of foods and Nutrition, University of Georgia, Athens 30602. Int J Obes 16:349-354

Kennedy, G. C. 1957. The development with age of hypothalamic restraint upon appetite of the rat. J. Endocrinol. 16:9

Kestin, S., Kennedy, R., Tonner, E., Kiernan, M., Cryer, A., Griffin, H.,

Kim, S. Y., Hwang, S. G., Koo, U. S., Koh, T. S. The production of egg yolk immunoglobulin (IgY) raised against 3T3L-1 cell membrane protein and the control of adipocyte differentiation. Korean J. Poult. Sci. 1999. 26:179-188

Leper, G. J and Jump, D. B. 1992. Retinoic acid dexamethasone interaction regulate s-4 gene transcription in 3T3-F442A adipocytes. Mol. Cell Endocrinol. 84:65-72

Man, M. Z., Hui, T. Y., Schatter, J-E., Lodish, H. F. and Bernlonr, D. A. 1990. Regulation of the murine adipocyte fatty acid transporter gene by insulin. Mol. Endocrinol. 10:1021-1028

McDougald, O. A., Cornelius, P., Liu, R., and Lane, M. D. 1995. Insulin negulates transcription of the CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) α, β, and genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. J. Biol, Chem. 270:647-654

Nada A., Abumrad, Claude. C., Forest, D. M., Regen, and Suzanne sanders. 1991. Increase in membrane uptake of long-chain fatty acids early during preadipocyte differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 88. July 1991. p. 6008-6012.

Niggins, D. A. 1989. Precipitation antibody of the duck(Anas platyrhynchos), Comparation Biochemistry and physiology. 93B:135-144

Niyogi, K., Kennel, S. J. and TerzagniHowe, M., 1987. Analysis of differentiation antigens on normal and carcinogen-altered rat epithelial cells in vivo and in culture. Differentiation 34:40-49

Pairault, J. and Francoise L. 1987. Control of the Adipogenic Differentiation of 3T3-F442A Cells by Retinoic Acid, Dexamethasone, and Insulin: A Topographic Analysis. Journal of cellular physiology 132:279-286

Petruschke, T. and Hauner, H. 1991. Tumor Necrosis Factor-α Prevents the differentiation of Human Adipocyte Precursor Cells and Causes Delipidation of Newly Developed Fat Cells. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 76, No 3

Pillion, D. J. and Czech, M. P. 1978. Antibodies against intrinsic adipocyte plasma membrane proteins activate D-glucose transport independent of interaction with insulin binding sites. J. Biol. Chem. 253:3761-3764.

Ramsay, T.G.,G.J.Hausman, and R.J.Martin.1987.Preadipocyte proliferation and differentiation in response to hormone supplementation of decapitated fetal pig sera. J. Anim. Sci. 64:735.

Reid, T .R., Torti, F. M. and Ringold, G. M. 1988. Evidence for Two Mechanism by Which Tumor Necrosis Factor Kills Cells. The Journal of biological chemistry

Shade, R., Stake, C., Strangham, D. 1996. The production of avain(egg yolk) antibodies : IgY : ATLA 24:925-934

Suryawan, A. and Hu, C. Y. 1997. Effect of Retinoic acid on differentiation of Cultured Pig Preadipocytes. J. Anim. Sci. 1997. 75:112-117

Torti, F. M. Torti, S. V. Larrick, J. W. and Ringold. G. M. 1989. Modulation of Adipocyte Differentiation by Tumor Necrosis Factor and Transforming Growth Factor Beta. The Journal of Cell Biology, Volume 108. March 1989. 1105-1113

Vernon, R. G. and Clegg, R. A. 1985. In New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development, (A. Cryer and R. L. R. Van, Eds), p. 65-86. London, Butterworths

Wangsness, P. J. and G. H. Soroka. 1979. Effect of energy concentration of milk on voluntary food intake of lean and obese piglets. J. Nutr. 108:595

Wassermann, F. 1965. In Handbook of Physiology. Section 5: Adipose Tissue, (A. E. Renold and G. F. Cahill, Jr., Eds), p. Washington, American Physiological Society, 87-100

Wright, J. T. and G. J. Hausman. 1990. Monoclonal antibodies against cell

surface antigens expressed during porcine adipogenic differentiation. International Journal of obesity. 14:395-409

Xue, Ji-chun., Schwarz, E. J., Chawla, A and Lazar. M. A. 1996. Distinct Stages in Adipogenesis Revealed by Retinoid Inhibition of Differentiation after Induction of PPARγ. Molecular and cellular biology, Apr. 1996. p. 1567-1575

Zhang, B., Erger, J. B., Hu, E., Szalkowski, D., White-Carrington, S., Spiegelman, B. M. and Moller, D. E. 1996. Negative Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Gene Expression Contributes to the Antiadipogenic Effects of Tumor Necrosis Factor-α. molecular Endocrinology, 1996. 10:1457-1466

제4장 돼지지방세포 전구세포의 분화에 미치는 항-항-돼지 지방세포 막단백질 토끼 IgG-IgY의 작용

제1절 摘 要

돼지의 지방조직 축적을 조절하기 위하여 항-지방세포 막 단백질 계란항체(IgY)와 항-항-지방세포 막단백질 토끼혈청(IgG)-IgY (Idiotype IgY)가 지방세포의 분화에 미치는 작용을 조사하였다. 항돼지 지방세포 막단백질 토끼-혈청(IgG)를 10 ug 및 50 ug으로 각각 생산된 IgY (Idiotype IgY) 및 대조의 항-돼지 지방세포 막단백질 IgY을 각각 분리 정제하여 ELISA법으로 친화성을 조사하였다. 항-돼지 지방세포 막단백질 IgY의 친화성은 최초 면역 후 첫번째 추가면역 4주까지는 뚜렷이 높아지지 않았으나, 그후는 시간의 경과와 함께 증가하였다. 두 번째 추가면역 후 8주의 친화성은 312 ng의 IgY까지 민감해졌으나 그 후 12주까지 더 높아지지 않았다. IgG 10 ug으로 생산된 idiotype IgY의 친화성은 50 ug의 IgG로 작제된 것과 동일하였다. 최초면역 2주 후부터 idiotype IgY의 친화성이 높아지기 시작하여 주령의 경과와 함께 높아져서 12 주의 친화성은 2.0 ng Idiotype IgY까지 민감해졌다. 약 25 kg 돼지 (랜드레이스)의 복부와 등부위 피하 지방조직을 콜라젠분해효소 1mg/mL와 함께 배양하여 분리한 지방세포 전구세포를 배양배지에서 배양하고 시험배지와 여기에 10 ug/mL의 인슐린이 함유된 분화배지에서 배양하였다. 분화배지에 농도를 달리한 포도당, TNF-α 그리고 IgG, IgY, idiotype IgY가 함유되었을 때의 지방세포 전구세포의 분화정도를 시험배지 및 분화배지에서의 분화상황과 비교하였다. 분화는 GPDH활성과 분화된 세포에 축적된 중성지방의 Oil Red O염색으로 조사하였다. 복부와 등 부위 피하 지방 유래 지방세포 전구세포는 시험배지에 비해 분화배지에서 배양하면 GPDH 활성이 유의하게 ($P< 0.05$) 높았고 Oil Red O의 붉은 염색상이 진해졌다. 분화배지에 TNF-α, IgY 및 Idiotype IgY를 첨가하여 배양된 전구세포의 GPDH 활성은 유의하게 ($P<0.05$) 낮아졌고 Oil Red O의 붉은 염색상이 묽어졌다. 분화배지의 포도당 농도가 20 mM로 높아짐에 따라 GPDH 활성은 증가하고 Oil Red O 염색은 진해졌으나, 분화배지중 TNF-α, IgG, IgY 및 Idiotype IgY의 농도가 높아짐에 GPDH 활성은 낮아지고, Oil Red O의 붉은 염색상은 묽어졌다 ($P<0.05$). 이상과 같이 돼지의 지방세포 막단백질에 대한 계란항체 (IgY)와 항지방세포 막 단백질 토끼 IgG에 대한 계란항체 (Idiotype IgY)가 중성지방의 생합성과 축적을 낮추었다. 이것은 지방세포 전구세포의 분화억제에 Idiotype-IgY의 사용이 가능하다는 것을 가리킨다.

제2절. 緖　論

채란계의 계란에 함유된 항체 (IgY)의 분리와 정제는 동물의 혈액채취 없이 다클론 항체 (IgY)를 만드는 방법이다 (Akita와 Nakai, 1992). Kim등 (1999)은 3T3 L1 지방 전구세포주에 대한 IgY를 생산하여 마우스에 주입하면 조류항체인 IgY도 포유류인 마우스의 지방축적량을 감소시킨다는 결과를 발표하였다. Koo등 (2000)은 돼지 지방세포 막단백질에 대한 다클론 IgY는 돼지의 피하지방과 복부지방 유래의 지방세포 전구세포가 지방세포로의 분화를 억제하는 작용을 조사하였다.

본 연구는 돼지지방세포 막단백질을 토끼에 주입해서 생산되는 항지방세포 막 단백질 토끼혈청을 정제한 것 (IgG)을 항원으로 계란항체 (Idiotype IgY)를 생산하여, 이것의 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 작용을 조사하였다.

제3절. 材料 및 方法

1. IgY의 생산

가. 돼지지방세포 막단백질의 분리 및 정제

돼지지방세포 막단백질은 Butterwith등 (1989)의 방법으로 추출분리 및 정제하였다. 축협 가락동 도축장에서 숫돼지의 복부 피하 지방조직을채취하여 제 3장에 설명된 바와 같이 지방세포막단백질을 분리 정제하여, 단백질함량을 측정한 뒤에 에펜돌프 튜브에 500 uL씩 분주하여 -80℃에 보관하였다.

나. 채란계의 면역과 IgY의 분리, 정제 및 친화성

77주령의 산란계 (Isa Brown) 1수당 10 ug 또는 50 ug의 돼지지방세포 막단백질/PBS 현탁액과 Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)의 유탁액 1 mL씩을 각각 2수의 채란계 가슴쪽 피하에 주입하였다. 최초 면역 (Immunization)후 4주 간격으로 두번 더 추가 면역 (Boosting)하였다. 최초면역 후 12주 동안 1주 간격으로 계란을 수집하였다. IgY의 분리 및 정제는 제2장 및 제3장에 설명하였다. 분리한 IgY펠렛은 PBS에 현탁한 후 투석막내에 넣고, 냉각 PBS를 3시간마다 8번 교체하면서 24시간 투석하였다. 투석후에 펠렛/PBS현탁액은 단백질을 정량하고, 1.5 mL 에펜돌프 튜브에 분주하여 -80℃에 보관하였다. IgY의 친화성은 제2장 과 제3장에 설명한바와 같다.

2. Idiotype IgY의 생산

가. IgG의 생산

1). 토끼의 면역과 IgG의 분리 및 정제

돼지 지방세포 막단백질 200 ug/PBS 현탁액과 같은 동량의 Ccomplete Freund's Adjuvant (CFA)의 유탁액을 6개월령의 토끼 (Angola) 2마리의 등부위 피하 네 군데에 주입하였다. 최초 면역 후 2주간격으로 돼지지방세포 막단백질 100 ug과 IFA의 유탁액으로 두번 추가 면역 하였다. 항원을 주입하기전에 토끼의 귀에서 혈액을 채취하여 4℃에서 3-4시간 방치한 뒤 3,000 rpm, 15 분간 원심하여 얻은 혈청을 -80℃에 보관하였다. 두번째 추가면역 2주후에 토끼를 에테르 (Diethyl ether)로 마취하고 심장천자로 50 mL 주사기로 혈액을가능한 모두 채취하여 37℃에서 1시간 방치하고, 3,000 rpm에서 15 분 원심하여 혈청을 수집하였다.

IgG의 정제 (Zeng등, 1994)는 채취된 혈청을 20,000 g에서 30 분 원심하여 침전된 세포를 분리제거하고 얼음 냉각된 비커에서 최종 황산암모늄 포화도가 50%가 되도록 혈청과 포화황산암모늄용액을 교반하면서 천천히 넣은 뒤에 6시간 더 교반하였다. 다음에는 10,000 g, 4℃에서 1시간 원심하여 취한 펠렛을 IgY의 분리 정제와 동일 한 방법으로 투석하여 보관하였다.

2). IgG의 친화성

항 돼지 지방세포 막단백질에 대한 토끼혈청 (IgG)의 친화성은 IgY의 친화성 (3절)과 동일한 방법으로 직접 ELISA법으로 평가하였다.

나. 항 지방세포 막 토끼 IgG에 대한 IgY (Idiotype IgY)의 생산

1). 채란계의 면역, idiotype IgY의 분리 및 정제

77주령의 산란계 (Isa Brown)에 1수당 10 ug 또는 50 ug의 정제된 토끼 IgG/PBS 현탁액과 IFA의 유탁액으로 주입한 최초 면역 후 4주간격으로 두번 더 추가 면역하였다. 항 지방세포 막 토끼 IgG에 대한 IgY (Idiotype IgY)의 분리 및 정제는 채란계의 면역과 IgY의 분리, 정제 (1항)과 동일하다.

2). Idiotype IgY의 친화성

정제된 토끼 IgG를 Carbonate/bicarbonate (pH 9.8)용액에 용해시켜, 96 well immuno plate의 각 well (0.25ug)에 넣고 4℃에서 12시간 배양하여 IgY의 친화성 (1-3항)과 동일한 방법으로 측정하였다.

3. 돼지지방세포 전구세포의 배양과 분화

가. 돼지지방세포 전구세포의 분리

25-30 kg의 랜드레이스종 수퇘지의 복부 (Abdominal subcutaneous Fat)와 등 부위 피하 지방 (Back subcutaneous Fat)을 채취하여 제3장에 설명한바와 같은 방법으로 지방세포 전구세포를 분리 배양하였다.

혈청 조제 : 지방세포 전구세포 분리시 경정맥을 통하여 채취한 혈액을 4℃, 16-24 시간 정치하고 3,000 rpm, 15 분 원심하여 얻은 혈청은 0.2 um 필터로 여과 멸균하고 15 mL 튜브에 분주하여, -20℃에 보관하여 시험배지 제조시에 이용하였다.

나. 돼지지방세포 전구세포의 배양 및 분화유도

분리한 지방세포전구세포는 배양배지에서 3일간 증식, 배양하고 시험배지 와 시험배지에 10 ug/mL 인슐린이 함유된 분화배지, 분화배지에 포도당 농도를 20 mM로 증가시키거나, 2 ng/mL의 TNF-α 그리고 5 ug/mL의 IgY, IgG 또는 Idiotype IgY를 각각 첨가하여 분화를 유도하였다. 6 well plate에서는 분화배지의 포도당 농도를 5, 10 및 20 mM로 증가시키거나, TNF-α는 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 ug/mL IgG, IgY, 그리고 Idiotype IgY는 각각 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ug/mL로 농도를 증가시켜 지방세포 전구세포의 분화를 각각 유도하였다. 제3장에 설명한 바와 같이 분화배양 뒤에 지방세포 전구세포의 GPDH의 활성을 측정하고 축적된 중성지방을 Oil red O로 염색하고 사진을 촬영하여 분화도를 측정하였다.

4. 통계분석

실험에서 얻어지 값들은 SAS (SAS Institude, Cary, NC, 1988)의 GLM으로 분산분석하고, Duncan의 다중 검정법 또는 Student's t 값으로 실험 값사이의 유의차를 검정하였다.

제3절. 結果 및 考察

1. 항체의 친화성

가. 계란항체(IgY)

돼지의 복부 피하 지방세포 막 단백질 50 ug로 생산한 항지방세포막단백질-IgY의 친화성을 Table 1에 주별로 나타내었다. 최초 면역후 4주까지는 증가하지 않았으나 추가 면역 (Boosting)한 4주 이후 8주째까지 그 반응성은 급속히 증가하나 8주의

2차 추가 면역 후에는 더 상승하지 않아서 12주까지 그대로 유지되었다. 최고 친화성의 IgY농도는 32배 희석 배율인 312 ng에서 나타내었다.

나. Idiotype IgY

1). IgG (토끼 항체)

복부지방조직에서 추출 정제한 지방세포 막 단백질에 대한 토끼항체 (IgG)의 친화성을 Figure 2에 나타내었다. 대조혈청과 비교하여 최초면역 2주에 32,000배, 4주에는 128,000배 그리고 6주에는 256,000배의 희석농도에서 지방세포 막 단백질과의 친화성을 보였다. 항원 주입 횟수를 증가시키고 주입후 시간이 지남에 따라 친화성이 상승하였다. 면역횟수의 증가와 면역후 시간 경과는 항체의 반응특이성을향상시켰다.

Table 1. Affinity of IgY raised against 50 ug of porcine adipocyte plasma membrane protein for the antigen during boosting period.

Immunization Period	Protein1)		IgY		
	Stimulation	Boosting	Antigen	Dilution	Ammount
weeks	ug/bird	ug/bird	ug/well	rate	ng/well
0	50	-	-	-	-
2	-	-	0.25	2	5.0
4	-	50	0.25	2	5.0
6	-	-	0.25	16	625.0
8	-	50	0.25	32	312.5
10	-	-	0.25	32	312.5
12	-	-	0.25	32	312.5

Affinity of anti-porcine abdominal adipose tissue membrane protein IgY with the porcine membrane protein (0.25 ug/well). Emulsion of 50 ug porcine membrane protein with incomplete Freund's adjuvant was used for the sensitization and boosting after 4 and 8week of the sensitization, respectively.

1) Purified adipose tissue plasma membrane protein.

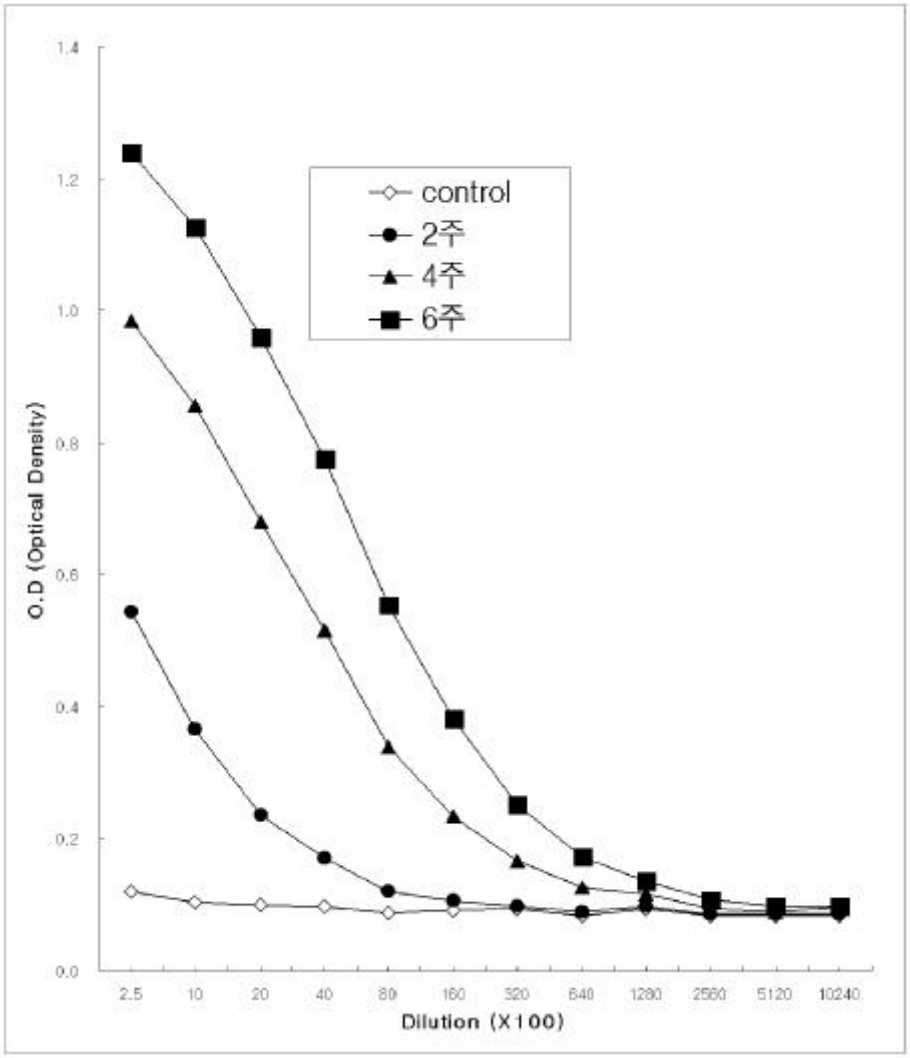


Figure 2. Affinity of anti-porcine abdominal adipose tissue membrane protein rabbit serum (IgG) for the porcine membrane protein(0.25 ug/well).
Rabbit was sensitized emulsion of 150 ug of the porcine membrane protein with complete Freund's adjuvant and boosted with the emulsion of 100 ug porcine membrane with incomplete Freund's adjuvant after 2, 4 and 6week of the sensitization.

2). IgG**의 주입량과** Idiotype **계란항체** (IgY)**의 반응성**

채란계에 IgG 10 ug을 주입하여 조성된 항 IgG-IgY (Idiotype IgY)와 IgG (0.25 ug/well)의 친화성을 최초면역후 1주부터 12주까지 주별로 Table 2에 나타내었다. Idiotype IgY의 친화성은 최초 면역후 2주부터 관찰되었으며, 주령의 경과에 따라 차츰 높아져서 추가 면역한 4주 후부터는 급격히 상승하였으며 2차 추가면역한 8주 이후 12주에는 512배 희석농도인 2.0 ng Idiotype IgY가 IgG와 반응하였다.

Table 2. Affinity of idiotype IgY raised against 10 ug of rabbit IgG with the antigen during immunization period.

Immunization Period	IgG1) Stimulation	IgG1) Boosting	Idiotype IgY Antigen	Idiotype IgY Dilution	Idiotype IgY Ammount
weeks	ug/bird	ug/bird	ug/well	rate	ng/well
0	10	-	-	-	-
2	-	-	0.25	32	31.2
4	-	10	0.25	32	31.2
6	-	-	0.25	64	15.6
8	-	10	0.25	128	7.8
10	-	-	0.25	128	7.8
12	-	-	0.25	512	2.0

Affinity (0.25 ug IgG/well) of egg immunoglobulin (idiotype IgY) raised against anti-porcine abdominal adipocyte plasma membrane protein rabbit IgG of 10 ug. Emulsion of 10 ug IgG with incomplete Freund's adjuvant was used for the sensitization and the boosting after 4 and 8 week of the sensitiztion, respectively.

1) Anti-adipose tissue plasma membrane protein rabbit IgG purified with the 50% ammonium sulfate and dialysised for 24 hrs changing PBS 8 times.

Table 3에는 IgG 50 ug으로 최초면역 후 1주부터 12주까지 생산된 Idiotype IgY의 친화성의 변화를 정리하였다. 최초면역 후 2주에는 4배의 항체 희석농도인 250 ng의 idiotype IgY와 IgG의 친화성이 있었다. 그 후 주령의 경과에 따라 반응성이 증가하여 4주에는 32배인 31.2 ng, 8주에는 7.8 ng, 12 주에는 512배의 항체

희석농도인 2.0 ng의 친화성이 존재하여 최고값을 나타내었다.

Table 3. Affitinity of idiotype IgY raised against 50 ug of rabbit IgG with the antigen during immunization period.

Immunization Period	IgG1) Stimulation	IgG1) Boosting	Antigen	Idiotype IgY Dilution	Idiotype IgY Ammount
weeks	ug/bird	ug/bird	ug/well	rate	ng/well
0	50	-	-	-	-
2	-	-	0.25	4	250
4	-	50	0.25	32	31.2
6	-	-	0.25	32	31.2
8	-	50	0.25	128	7.8
10	-	-	0.25	128	7.8
12	-	-	0.25	512	2.0

Affinity (0.25 ug IgG/well) of egg immunoglobulin (idiotype IgY) raised against anti-porcine abdominal adipocyte plasma membrane protein rabbit IgG of 50 ug. Emulsion of 50 ug IgG with incomplete Freund's adjuvant was used for the sensitization and boosting after 4 and 8 week of the sensitiztion, respectively.
1) Anti-adipose tissue plasma membrane protein rabbit IgG purified with the 50% ammonium sulfate and dialysised for 24 hrs changing PBS 8 times.

다. 고찰

1) Idiotype IgY의 생산

돼지의 정제된 지방세포 막 단백질 50 ug과 IFA의 유탁액을 항원으로 생산된 IgY는 최초면역 후 8주에 312 ng과 친화성이 있었다. Koo (2000)는 최초면역과 추가면역에 막단백질을 200 또는 250 ug을 사용하여 3주 후 well당 0.5ug을 분배하여 98 ng의 IgY와 친화성이 있었다. 한편 Koo (2000)는 분화된 세포의 세포용해물을 면역하여 생산된 IgY는 0.5 ug의 세포용해물과 391 ng의 IgY의 친화성이 있다는 것을 발견하였

다. 본 연구에 비해서 Koo (2000)는 well에 분배하는 단백질양이 많았고 면역기간이 짧았다. 그리고 항원으로 사용한 단백질량이 많았고 최초면역시에는 CFA로 면역 자극하고 추가면역부터는 IFA를 사용하였다.

본 실험에서는 10 ug의 돼지 지방세포 막단백질과 IFA의 유탁액으로 시도된 IgY의 생산에 사용한 닭들이 계란을 낳지 않았다. 그러나 실험에 어떤 잘못이 있었는지 그 이유는 설명하지 못하였다. 한편 10 ug의 토끼 정제 IgG와 IFA의 유상액을 주입하면 높은 역가인 2ng의 IgY (Idiotype)에서 친화성을 가지는 항-IgG-IgY가 생산되었다. 이러한 성적을 고려하면 10 ug의 돼지 지방세포 막단백질로 IgY 생산이 불가능하다는 판단을 내릴 수 없다고 생각된다. 따라서 10 ug의 지방세포 막 단백질을 항원으로 IgY의 생산이 가능한지는 다시 실험해야 할 것으로 생각된다. 항원의 주입횟수와 시간에 따라 그 반응성이 증가하는 것은 Koo (2000)의 실험과 같은 현상이다.

본 연구에서 IgG 10 ug 면역시 IgG 50 ug 면역시의 생산된 항체 (Idiotype IgY)의 친화성은 동일하였다. 가금에서는 토끼에 비하여 적은 량의 항원으로 반응성이 높은 항체를 생산할수 있다 (Goodman등, 1951)는 보고는 이미 잘 알려져 있다. Shade 등 (1996)이 성계 면역시에 10-100 ug의 항원을 4-8주의 간격으로 2-3회 주입하여도 높은 반응성의 계란항체 (IgY)가 생산된다고 하였다. 본 실험성적은 Shade등 (1996)의 결과와 일치하였다. 면역부위는 Shade와는 달리 흉근의 근육에 주사하였다. 제 21차 유럽대체방법에 대한 워크숍 (The 21st European workshop on alternative methods)에서 추천한 IgY생산 프로토콜도 IFA와 항원 10-100 ug의 현탁액으로 면역할 것을 추천하고 있다.

본 실험에서도 최초 면역시에 CFA를 사용하는 대신 IFA를 이용하여도 높은 친화성의 항체 (IgY)를 닭에서 생산된다는 것을 나타내었다.

2) 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 IgG, IgY 및 Idiotype IgY의 작용

돼지 복부와 등부위 피하 지방세포 전구세포를 시험배지와 분화배지 그리고 분화배지에 포도당농도를 20 mM로 증가시키거나, 2 ng/mL의 TNF-α, 5 ug/mL의 IgG, 5 ug/mL의 IgY 그리고 5 ug/mL의 Idiotype IgY를 각각 함유시켜 분화를 유도한 뒤에 지방세포 전구세포의 GPDH 활성을 Table 4에 나타내었다.

분화배지중 GPDH 활성은 시험배지에 비해서 복부 피하 지방의 지방세포 전구세포에서는 상승하는 경향이 있었으나, 등 부위 피하 지방에서는 유의하게 ($P<0.05$) 증가하였다. 분화배지중의 포도당 농도가 20 mM로 높아지면 복부 지방세포 전구세포에서는 GPDH 활성이 증가하는 경향이 있었으나, 등 부위 전구세포에서는 포도당 농도증가의 영향이 발견되지 않았다.

분화배지에 TNF-α, IgY 및 Idiotype IgY가 함유되면 복부와 등 부위 지방세포

전구세포 모두 분화배지에서 분화를 유도한것보다 GPDH **활성이 낮아졌다** (P< 0.01). **그 중에서** Idiotype IgY**는** GPDH**활성을 가장 낮추었다** (P< 0.05).

Table 4. Function of TNF-α, IgY and idiotype IgY on the glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of adipocyte precursor cells of abdominal and back subcutaneous adipose tissue of pigs.

Factor	Treatment	GPDH	
		Abdominal	Back
		NADH nmol/mg/min	
Basal	Non	35.6±2.8bc	33.3±0.3bc
Control	Insulin	44.4±9.0ab	64.2±12.5a*
Adipogenic	Glucose	54.1±10.3a	37.9±5.3bc*
Anti adipogenic	TNF-α	29.2±6.0c	26.6±11.0c
Antibody	IgG	42.6±4.5b	27.7±4.2bc*
Antibody	IgY	24.1±7.0cd	38.7±2.5b*
Antibody	Idiotype IgY	15.1±2.1d	8.2±3.0c*
SEM			2.20
LSD (Tissue) p< .05			11.0 (6.3)
P value			
	Tissue		0.91
	Treatment		>0.01
	Tissue * Treatment		>0.01

Values are the average of 3 replicates ± SD. Adipocyte precursor cells proliferated to reach confluence in plating medium with 10% FBS, and then incubated with testing medium containing 2.5% porcine serum, 0.25 mM dexamethasone, and 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin, and differentiation medium containing 10 ug/mL insulin, and the differentiation medium with 20 mM glucose, 2 ng/mL TNF-α, 5 ug/mL IgG, 5 ug/mL IgY, and 5 ug/mL Idiotype IgY for 7-10days, respectively.

a d : Means with a column with no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at P<0.05.

Photo 1**은 복부 전구세포 그리고** Photo 2**는 등 부위 전구세포를** Table 4**와 동일한 조건으로 분화를 유도하여 중성지방축적 현상을** Oil Red O**로 염색하여** 400**배에서**

촬영한 사진이다. Oil Red O에 의한 적색도는 분화배지중의 포도당 농도를 높였을 때 시험배지에 비해서 진했고, TNF-α, IgY 및 Idiotype IgY 첨가시 분화배지에 비해서 묽어졌다. 이것은 분화배지중의 포도당 농도를 높였을 때 지방세포 전구세포의 분화가 활발히 일어나고, TNF-α, IgY 및 Idiotype IgY 첨가시 지방세포 전구세포의 분화가 낮아진다는 것이 육안으로 확인되었다. Oil Red O 염색결과는 복부지방과 등지방의 지방세포 전구세포 모두 GPDH 활성시와 비슷한 결과를 나타내었다.

3. 지방세포 전구세포의 분화에 미치는 포도당과 TNF-α 농도의 영향

3-1. 포도당

복부와 등부위 피하 지방조직의 지방세포 전구세포의 분화배지중의 포도당 농도가 GPDH 활성에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 시험배지에서 배양한 것에 비해서 복부 및 등부위 피하 지방 지방조직 지방세포 전구세포를 분화배지에서 배양하면 GPDH활성이 유의하게 ($P<0.05$) 높았다. 포도당의 농도에 따라서 지방세포 전구세포의 GPDH 활성이 상승하는 경향이 있었으나 분화배지에서 배양한 것보다 유의하게 ($P<0.05$) 낮았다.

Photo 3은 복부 그리고 Photo 4는 등부위 지방세포 전구세포를 Table 5와 동일한 조건으로 분화 배양하여 중성지방의 축적상황을 Oil Red O로 염색하여 400배로 촬영한 사진이다. 복부와 등 부위 전구세포 모두 포도당 농도가 높아짐에 따라 붉은 색으로 염색되는 부분이 많아졌다. 이것은 지방세포 전구세포의 분화가 포도당 농도에 따라 많아진다는 것을 나타낸다고 생각되었다.

Peter등 (1979)은 인슐린만으로 분화유도한 3T3L1세포에 비해 포도당을 더 첨가한 배지로 분화유도하면 세포의 분화도가 더 높았고, 포도당의 농도에 따라 분화도가 증가한다고 하였다. Peter등 (1979)의 결과와 상기 성적은 비슷한 경향이라고 생각되었다. 그러나 상기실험에서 분화배지에 비해서 분화배지중의 포도당 농도가 높아지면 GPDH의 활성이 낮아지는 현상이 발견되었다. 그 원인이 본 실험에서는 설명할 수 있었으나 GPDH 활성 측정과 Oil Red O 염색을 위한 분화 세포의 수확시기가 너무 늦었던 것이 가장 중요한 원인이라 생각되었다. 이런 점을 고려하여 재확인 실험이 필요하다고 생각된다.

지방세포 전구세포의 분화는 성장 홀몬등 호르몬과 수많은 지방 생합성 효소들의 활성화를 위한 유전자발현에 의해 진행된다 (MacDougald등, 1995). 지방세포분화에 관여하는 지방생합성 효소의 활성은 인슐린수준에 의해 조절된다 (Cryer등, 1976, Borensztain등, 1972). 인슐린은 포도당의 이동과 대사를 자극하고 Lipoprotein Lipase 등의 활성을 조절한다고 한다 (Rosen등, 1978). 포도당은 지방세포 전구세포의 초기분

화시 생성되는 지방생합성 효소들의 활성을 조절한다 (Patten, 1970). 세포내로 포도당을 운반하는 포도당 운반수용체 GLUT-1과 GLUT-4는 세포내 인슐린수준에 따라 조절됨으로 지방세포내 포도당의 수준은 인슐린에 의해 결정되어진다 (James등, 1989, Cushman과 Wardizala, 1980).

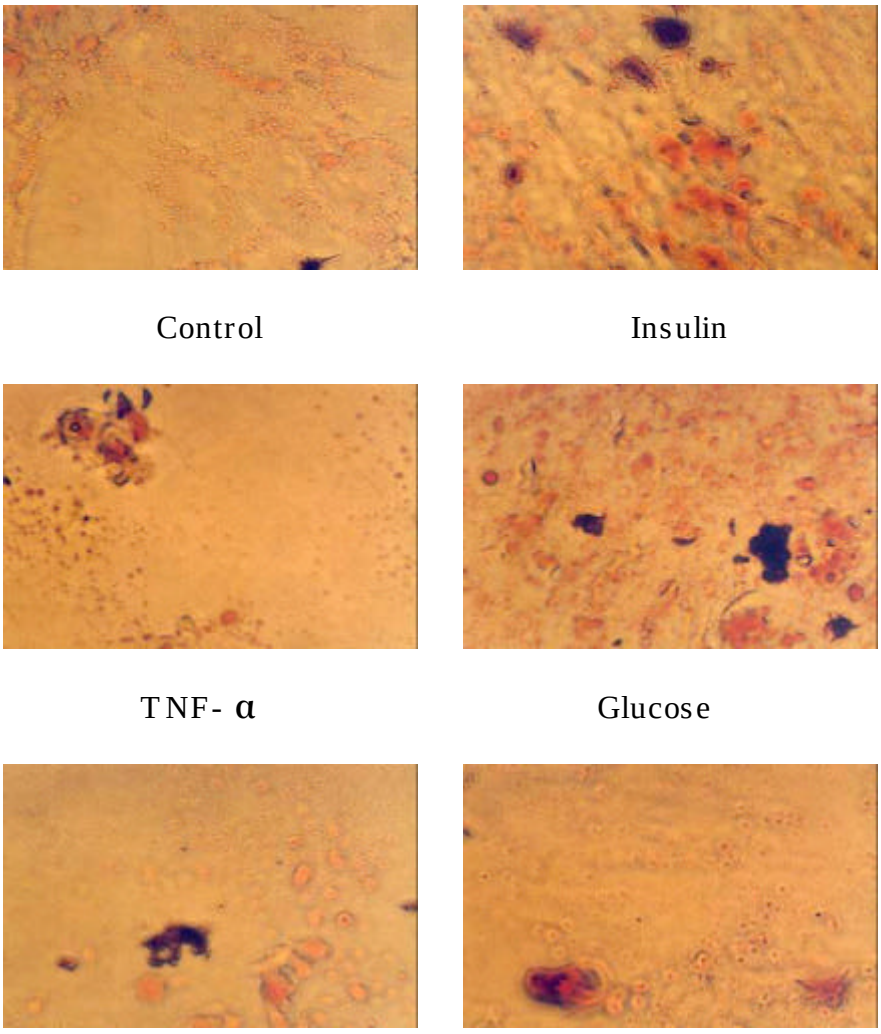
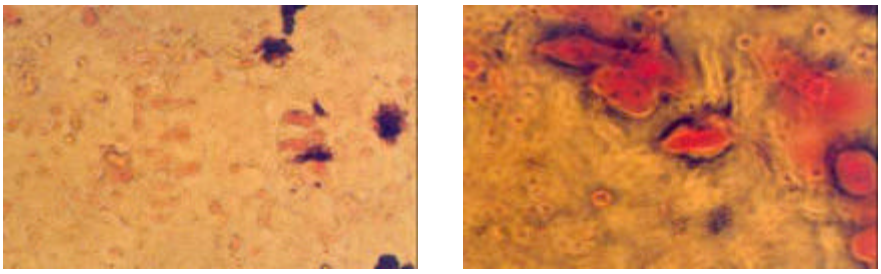
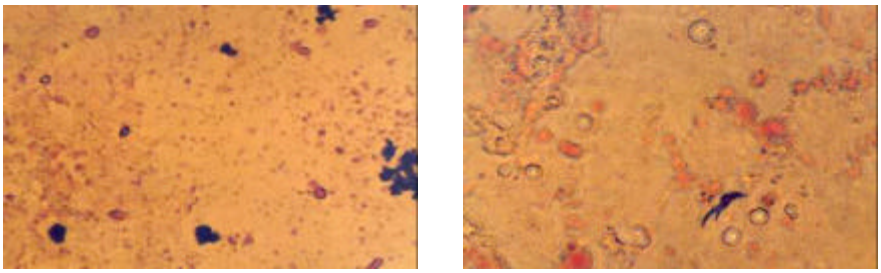


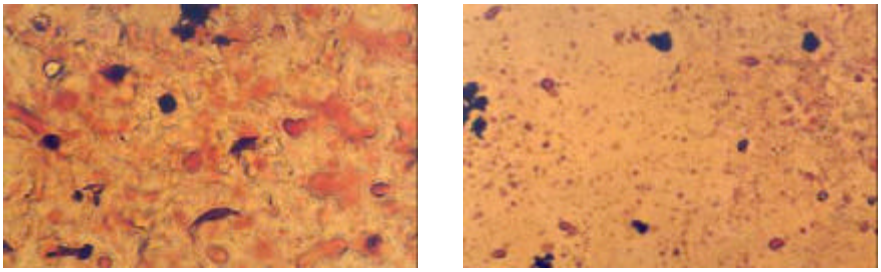
Photo 1. Oil Red O microscopy (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with 20 mM glucose, 2 g/mL TNF-α, 5 ug/mL IgY and 5 ug/mL Idiotype IgY, respectively.



Control Insulin



TNF-α Glucose



IgY Idiotype IgY

Photo 2. Oil Red O microscopy (×400) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with 20 mM glucose, 2 ng/mL TNF-α, 5 ug/mL IgY and 5 ug/mL Idiotype IgY, respectively.

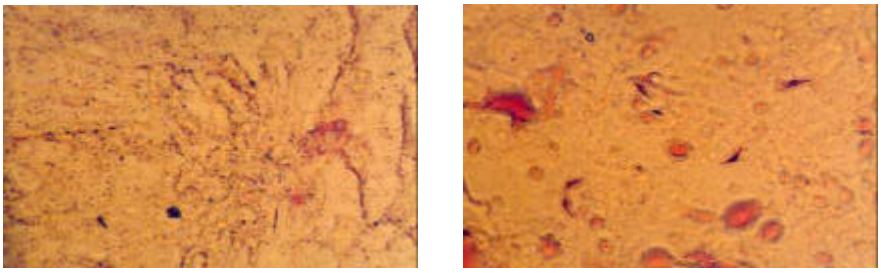
Table 5. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of adipocyte precursor cells of abdominal and back subcutaneous adipose tissue of pigs incubated in the differentiation medium increased glucose levels.

Treatment		GPDH	
Insulin	Glucose	Abdominal	Back
ug/mL	mM	NADH nmol/mg/min	
0	0	28.4±0.1b	24.8±14.2c
10	0	51.0±5.5a	54.7±6.0a
10	5	26.2±1.2b	16.1±4.0a
10	10	27.1±5.7b	38.3±0.1b
10	20	32.1±8.3b	44.1±3.3b

SEM		2.39
LSD (Tissue)	p< .05	7.6 (4.8)
P value		
	Tissue	0.26
	Level	>0.01
	Tissue * level	>0.05

Values are the average of 3 replicates ± SD.

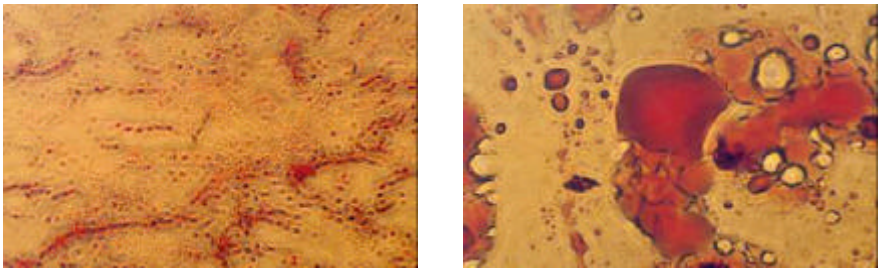
a d : Means with a column wiyh no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at P<0.05.



Control 5 mM Glucose

Photo 3. Oil Red O microscopy (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte

precursor cells incubated with differentiation medium containing with Glucose 5 mM, 10 mM and 20 mM, respectively.



Control Insulin

20 mM Glucose

Photo 4. Oil Red O microscopy (×400) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with Glucose 5 mM, 10 mM and 20 mM, respectively.

3-2. TNF-α (Tumor Necrosis Factor - α)

지방세포 전구세포의 분화배지에 첨가하는 TNF-α의 농도를 증가시켰을 때의 GPDH 활성의 변화를 Table 6에 나타내었다. 복부와 등 부위 피하 지방의 지방세포 전구세포 모두 분화배지 중의 TNF-α수준이 0.1, 0.5, 1.0, 및 2.0 ug/mL로 높아짐에 따라 GPDH의 활성이 점차 낮아졌다 (P< 0.01). 복부 피하 지방의 지방세포 전구세포의 GPDH 활성은 등 부위 피하지방의 값들에 비해서 TNF-α의 농도에 관계없이 낮았다 (P<0.05). 등 부위 지방세포 전구세포는 분화배지에 TNF-α 0.1 ug/mL가 함유되어도 GPDH활성이 분화배지에서의 값과 비슷하였다. 따라서 등 부위 지방은 TNF-α에 대한 저항성이 높다는 것을 나타내었다.

Photo 5은 복부 그리고 Photo 6은 등 부위 지방세포 전구세포를 Table 6과 같은 조건으로 분화 유도시 Oil Red O 염색하여 400배에서 촬영한 사진이다. 복부와 등부위 지방세포 전구세포 모두 TNF-α 농도가 높아짐에 따라 Oil Red O에 의한 붉은 염색이 묽어졌다. 이것은 TNF-α의 농도가 높아짐에 따라 세포의 분화가 점차 억제되고 있다는 것을 나타낸다. 이러한 Oil Red O 염색결과는 TNF-α의 농도가 GPDH 활성에 미치는 영향과 동일한 결과이다.

Table 6. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of adipocyte precursor cells of abdominal and back of pigs incubated in the differentiation medium added various levels of TNF-α.

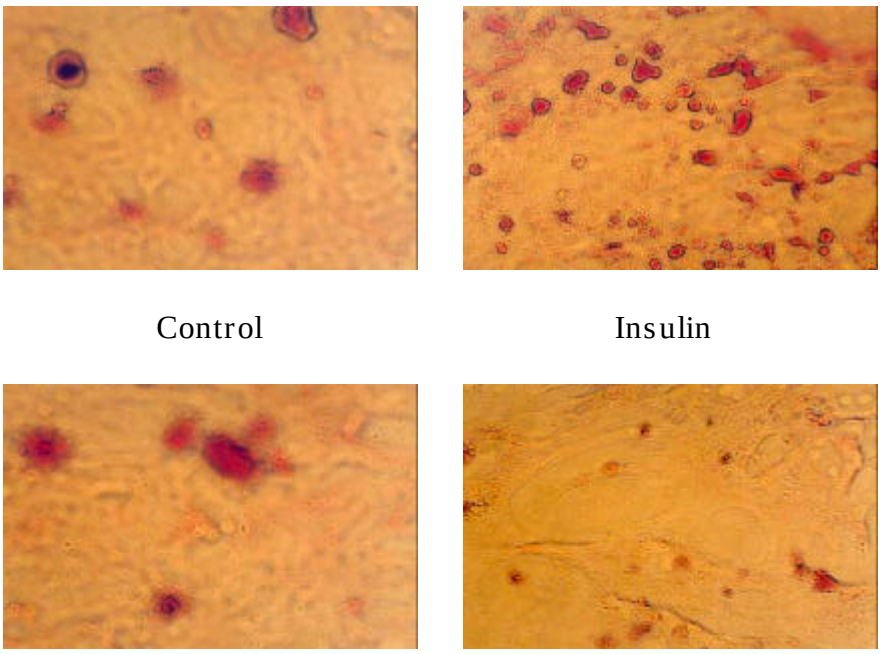
Treatment		GPDH	
Insulin	TNF-α	Abdominal	Back
ug/mL	ng/mL	NADH nmol/mg/min	
0	0	15.7±3.2c	15.5±5.4c
10	0	42.5±18.0a	71.1±9.7a*
10	0.1	32.4±1.3ab	72.1±2.9a*
10	0.5	28.5±1.5b	54.0±12.6b*
10	1.0	13.5±12.0c	49.86±12.1b*
10	2.0	12.2±9.9c	22.68±0.9c*
SEM			3.75
LSD (Tissue) p< .05			11.0 (6.3)
P values			
	Tissue		>0.01
	Level		>0.01
	Tissue * level		>0.01

Values are the average of 3 replicates ± SD.

a d : Means with a column wiyh no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at P<0.05.

TNF-α는 Macrophage에서 분비되는 사이토카인 (Cytokine)으로 종양세포에 대해서만 세포독성 (Cytotoxic)과 세포분열 억제(Cytostatic)효과를 갖고 있다 (Carswell등, 1975, Old등, 1985, Helson등, 1975). 이러한 선택적 작용은 수용기의 수의 의해 결정

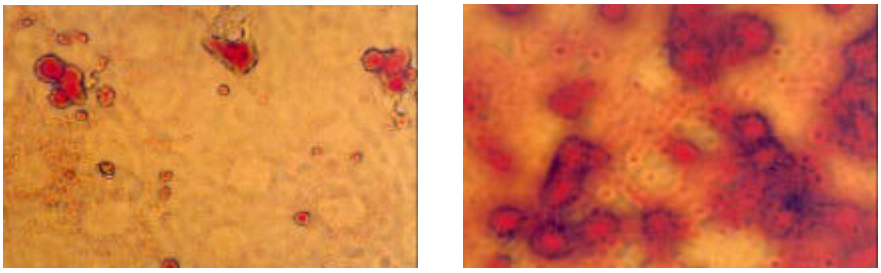
되며 (Sugarman등, 1985), TNF-α는 체내대사에 있어 섬유아세포 (fibroblast cells)의 성장을 증진시키고 (Vilcek등, 1986), 호중구 (neutrophils)를 활성화시키며 (Shalaby등, 1985), 근육세포의 분화를 억제시킨다 (Miller등, 1988). 그리고지방세포의 유전자 발현을 억제하여 지방세포의 분화를 억제한다 (Torti등, 1985). Stephen과 Pekala등 (1992)은 TNF-α가 3T3L1세포의 분화를 억제한다고 보고하였다. Petruschke와 Hauner (1993)의 실험에 따르면, 사람 지방세포 전구세포의 분화 배양시 TNF-α를 첨가하면, 지방세포수와 GPDH활성이 TNF-α의 농도와 분화유도시간에 따라 감소한다고 하였다. 본 실험 성적과 Petruschke와 Hauner (1993)의 성적은 유사한 결과라고 생각되었다.



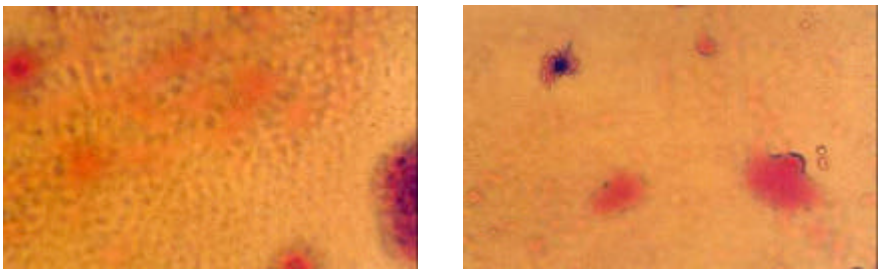
Control Insulin

1.0 ng TNF-α 2.0 ng TNF-α

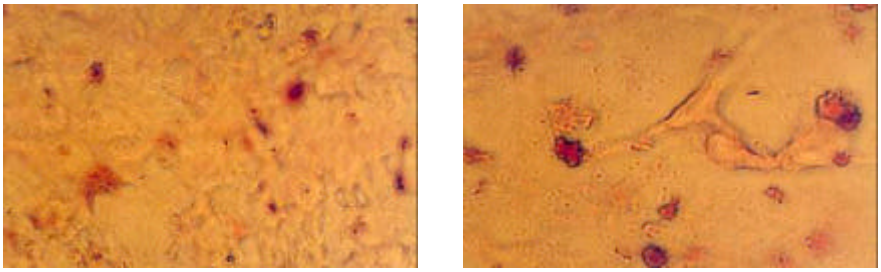
Photo 5. Oil Red O microscopy (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with TNF-α 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 ng/mL, respectively.



Control Insulin



0.1 ng TNF-α 0.5 ng TNF-α



1.0 ng TNF-α 2.0 ng TNF-α

Photo 6. Oil Red O microscopy (×400) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with TNF-α 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 ng/mL, respectively.

4. 지방세포 전구세포의 분화와 IgG, IgY 및 Idiotype IgY 농도

4-1. IgG

Table 7에는 돼지 지방세포 전구세포를 분화배지에서 분화유도시에 첨가한 토끼항

체 (IgG)의 농도에 따른 GPDH 활성의 변화를 나타내었다. 분화배지로 배양한 복부와 등부위 지방세포의 GPDH 활성은 시험배지에서 배양한 것에 비해서 유의하게 ($P<0.05$) 높았다. 복부와 등 부위 전구세포 배양시에 IgG 농도가 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ug/mL의 높아짐에 따라 GPDH의 활성은 낮아졌다 ($P<0.01$). 그러나 복부 지방세포 전구세포에서는 분화배지에 0.5 ug/mL의 IgG가 첨가되면 분화배지의 GPDH 값과 유의차가 없었으나 등 부위 전구세포에서는 분화배지에서의 GPDH값에 비해서 유의하게 ($P<0.05$) 낮아졌다. 등 부위 지방세포 전구세포의 GPDH 활성은 복부의 값들에 비해서 유의하게 ($P<0.05$) 낮아서 IgG에 대한 감수성은 등 부위 전구세포에서 높았다.

Table 7. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of adipocyte precursor cells of abdominal and back of pigs incubated in the differentiation medium added various levels of IgG.

Treatment		GPDH	
Insulin	IgG	Abdominal	Back
ug/mL	ug/mL	NADH nmol/mg/min	
0	0	35.0±14.9bc	33.2±0.9b
10	0	60.2±6.4a	53.3±4.7a
10	0.5	62.5±13.9a	36.4±24.2b*
10	1.0	50.9±21.7ab	28.3±14.0bc*
10	2.5	36.3±4.9b	30.8±6.6bc
10	5.0	26.5±3.5c	18.3±6.3c

SEM		2.85
LSD (Tissue) p< .05		14.8 (8.5)
P value		
	Tissue	>0.01
	Level	>0.01
	Tissue * level	0.45

Values are the average of 3 replicates ± SD.

a d : Means with a column wiyh no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at $P<0.05$.

Photo 7은 복부 그리고 Photo 8은 등 부위 지방세포 전구세포를 Table 7과 같은 조건으로 분화 유도한 다음 각각 Oil Red O로 염색한 사진이다. 복부와 등 부위 전구세포 모두 IgG농도가 높아지면 Oil Red O의 붉은 염색도가 점차 묽어진다는 것을 육안으로 알 수 있었다. 지방세포 전구세포의 지방축적이 분화배지중의 IgG 농도와 반비례한다는 것을 나타내었다.

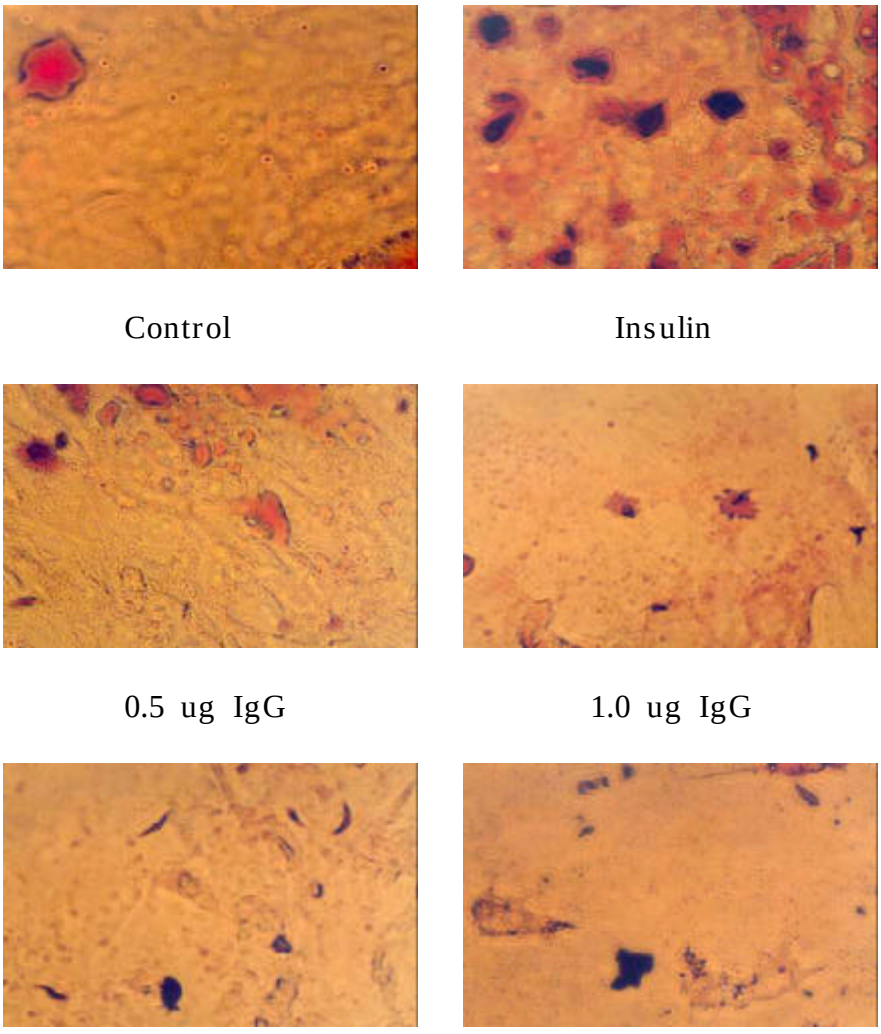


Photo 7. Photograph (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with IgG in differentiation medium and stained with Oil Red O

4-2. IgY

복부와 등부위 피하 지방의 지방세포 전구세포의 분화배지에 첨가한 항 지방세포 막단백질 IgY 농도에 따른 GPDH 활성의 변화를 Table 8에 표시하였다. 복부와 등부위 지방세포 전구세포를 분화배지에서 배양하면 GPDH 활성이 시험배지에서 배양한 것에 비해서 유의하게 ($P<0.05$) 높았다. 복부와 등 부위 지방세포 전구세포의 분화배지에 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 ug/mL로 IgY농도를 높임에 따라 GPDH의 활성이 점차 유의하게 ($P<0.05$) 낮아졌다. 분화배지에 0.5 ug/mL의 IgY가 첨가되면, GPDH 활성은 복부전구세포에서는 분화배지와 유의차가 발생되지 않았으나 등 부위 전구세포에서는 유의하게 ($P<0.05$) 감소하였다.

Photo 9은 복부 그리고 Photo 10은 등 부위 지방세포 전구세포의 Oil Red O 염색결과이다. IgY농도가 높아짐에 따라 복부와 등 부위 전구세포 모두 Oil Red O의 붉은 염색정도가 점차 묽어졌다. 이것은 중성지방의 축적이 낮아지는 것을 나타내며, 중성지방의 축적이 적어지는 것은 지방세포 전구세포의 분화정도가 약해지는 것을 나타낼런지도 모른다.

Kim등 (1999)은 3T3L1 지방 전구세포주에 대한 IgY를 마우스에 주입하면 마우스의 지방축적량이 감소한다는 결과를 발표하였다. 이러한 결과들은 본 연구에서의 성적과 동일한지 검토할 필요가 있다고 생각된다.

4-3. Idiotype IgY

지방세포 전구세포의 분화배지에 Idiotype IgY농도를 달리 첨가하여 배양했을 때의 GPDH 활성 변화를 Table 9에 나타내었다. 복부지방 지방세포 전구세포의 배양시에는 Idiotype IgY의 농도가 높아짐에 따라 GPDH활성이 점차 낮아졌다 ($P<0.05$). 5.0 ug/mL의 Idiotype IgY을 첨가했을 때 GPDH의 활성이 가장 낮았다. 등 부위 지방세포 전구세포의 분화배지에 Idiotype IgY를 첨가하여 배양하면 GPDH활성이 분화배지의 값에 비해서 감소하나 첨가한 Idiotype IgY의 농도 사이에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 등 부위 전구세포에서는 Idiotype IgY의 첨가량에 따라 GPDH의 활성의 변화가 없는 이유는 본 실험에서 평가되지 않았다.

이러한 결과는 Idiotype IgY생산시 토끼에 주입된 항원인 지방세포 막 단백질 채취부위가 복부지방조직이었던 것에 기인할런지도 모른다. 그러나 분화배지에 Idiotype IgY를 첨가하면,복부 전구세포에 비해서 등 부위 전구세포에서 Idiotype IgY에 의한 분화억제가 유의하게 ($P<0.05$) 낮았다. 이것은 등지방 피하조직에서 오히려 Idiotype IgY에 더 민감하다는 것을 나타낸다고 생각되었다. IgY에 의한 지방세포 전구세포의 GPDH 활성 억제 또는 지방 생합성감소에 대한 메카니즘 및 원인의 연구는 앞으로의 과제라고 생각된다.

Photo 11은 복부 지방세포 그리고 Photo 12는 등 부위 지방세포 전구세포를

Table 9와 같은 조건으로 배양했을 때 분화된 지방세포의 지방에 대한 Oil Red O 염색결과를 400배로 촬영한 사진이다. 복부 및 등 부위 전구세포 모두 0.1, 0.5, 1.0, 및 2.0 ug/mL으로 Idiotype IgY 농도가 높아짐에 따라 Oil Red O세포의 붉은 염색도가 묽어진다는 것이 육안으로 확인 되었다. 이것은 GPDH 활성에 미치는 Idiotypr IgY의 작용과 동일한 결과라고 생각된다. 전구세포 분화배양시 GPDH 활성과 Oil Red O 붉은 염색 결과로부터 세포의 분화가 점차 Idiotype IgY 농도에 따라 억제된다는 것을 의미할런지도 모른다.

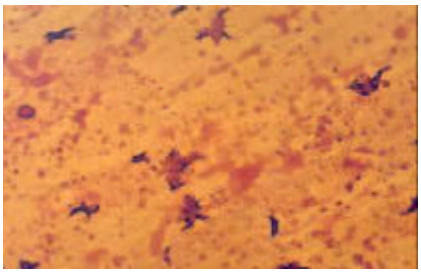
Table 8. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity of adipocyte precursor cells of abdominal and back of pigs incubated with IgY in differentiation medium

Treatment		GPDH	
Insulin	IgY	Abdominal	Back
ug/mL	ug/mL	NADH nmol/mg/min	
0	0	28.0±18.6b	31.8±6.3b
10	0	51.0±5.5a	73.0±15.3a*
10	0.5	56.9±8.0a	36.6±0.2b*
10	1.0	43.4±2.0ab	35.4±23.0b
10	2.5	37.4±26.3ab	23.70±19.9b*
10	5.0	29.4±6.0b	20.5±14.4b

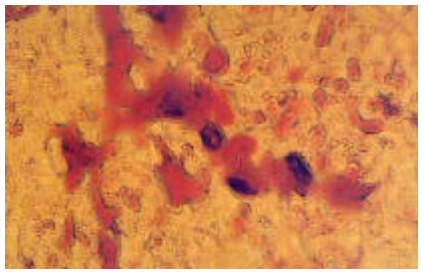
SEM		3.17
LSD (Tissue) p< .05		17.5 (10.1)
P value		
	Tissue	0.40
	Level	>0.01
	Tissue * level	0.20

Values are the average of 3 replicates ± SD.

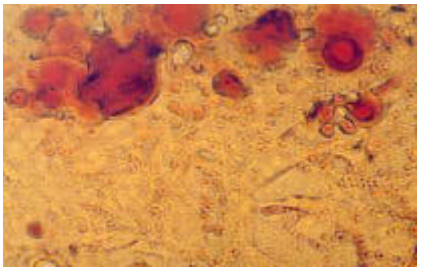
a d : Means with a column wiyh no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at P<0.05.



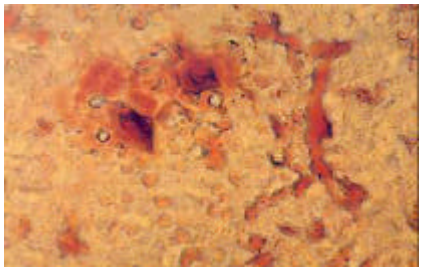
Control



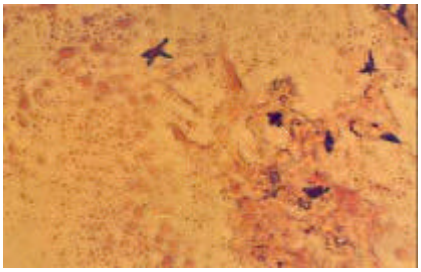
Insulin



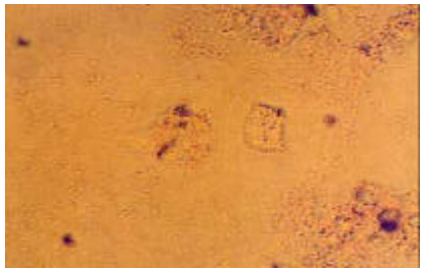
0.5 ug IgY



1.0 ug IgY



2.5 ug IgY



5.0 ug IgY

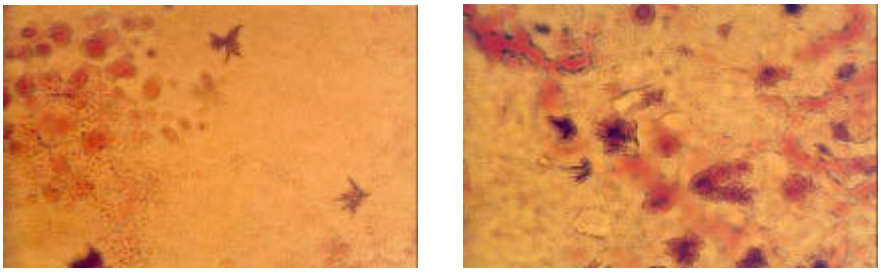
Photo 9. Oil Red O microscopy (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing with IgY 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 ug/mL, respectively.

Table 9. Function of idiotype IgY on the Glycerol-3- phosphate dehydrogenase activity of swine adipocyte precursor cells from abdominal and back subcutaneous adipose tissue incubated in the differentiation medium

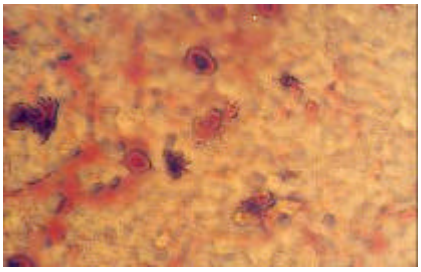
Treatment		GPDH	
Insulin	Idiotype IgY	Abdominal	Back
ug/mL	ug/mL	NADH nmol/mg/min	
0	0	28.9±9.6c	20.1±6.2b
10	0	72.3±26.4a	77.7±19.7a
10	0.5	58.4±12.0ab	30.5±3.8b*
10	1.0	47.7±21.5b	29.0±14.4b*
10	2.5	40.5±6.4bc	28.8±17.6b*
10	5.0	26.8±11.6c	26.9±0.7b

SEM		3.25
LSD (Tissue) p< .05		14.7 (8.5)
P value		
	Tissue	> 0.05
	Level	> 0.01
	Tissue * level	0.25

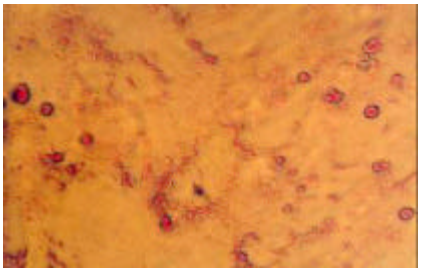
Values are the average of 4 replicates ± SD.
a d : Means with a column wiyh no common superscript, * : means between abdominal and subcutaneous adipocyte precursor cells in a row differ significantly at P< 0.05.



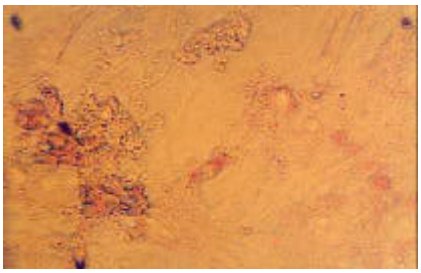
Control Insulin



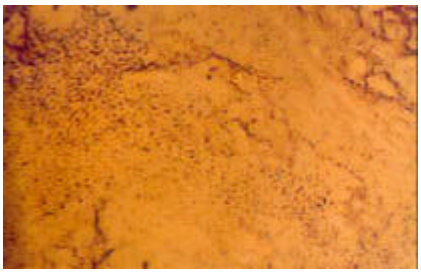
0.5 ug Idiotype IgY



1.0 ug Idiotype IgY

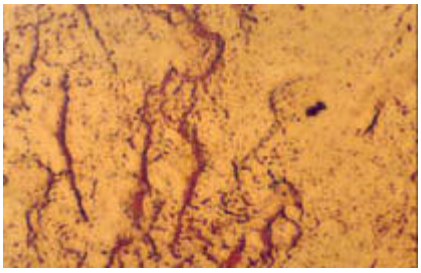


2.5 ug Idiotype IgY

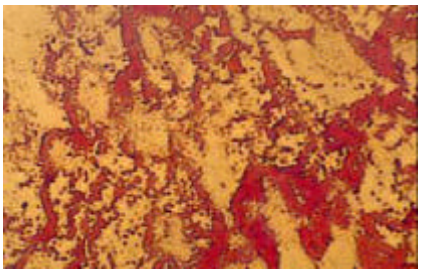


5.0 ug Idiotype IgY

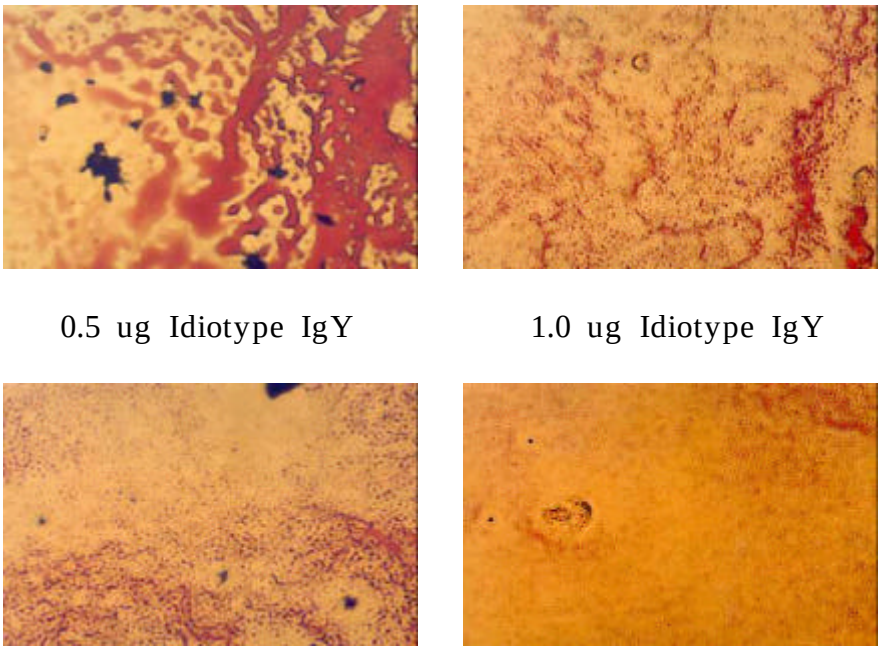
Photo 11. Oil Red O microscopy (×400) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing Idiotype IgY 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 ug/mL, respectively.



Control



Insulin



0.5 ug Idiotype IgY　　1.0 ug Idiotype IgY

2.5 ug Idiotype IgY　　5.0 ug Idiotype IgY

Photo 12. Oil Red O microscopy (×400) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with differentiation medium containing Idiotype IgY 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 ug/mL, respectively.

제5절 參考文獻

Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J. Food Sci. 57 : 629-634.

Borensztain, D., R. J. Salmols and A. H. Rubenstein. 1972. Effects of insulin on lipoprotein lipase activity in the rat heart and adipose tissue. Am. J. Physiol. 223 : 1271-1275.

Butterwith, S. C., S. Kestin, H. D. Griffin and D. J. Flint. 1989. Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors: lack of tissue specificity. Br. Poult. Sci. 30 : 371-378.

Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and Williamson, B. D. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 72 : 3666-3670.

Cryer, A., S. E. Riley, E. R. Williams and P. S. Robinson. 1976. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations. Clin. Sci. Mol. Med. 50 : 213-221.

Cushman, S. W. and L. J. Wardizala. 1980. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 255 : 4758-4762.

Goodman, M., H. R. Wolfe and S. Nortan. 1951. Precipitin production in chickens. VI. The effect of varying concentrations of NaCl on precipitate formation. Journal of Immunology 66 : 225-236.

Helson, L., S. Green, E. A. Carswell and L. J. Old. 1975. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature 258 : 731-732.

James, D. E., M. Strube and M. Mueckler. 1989. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature 338 : 83-87.

Kim, S. Y., S. G. Hang, U. S. Koo and T. S. Koh. 1999. The production of egg yolk immunoglobulin (IgY) raised against 3T3L-1 cell membrane protein and the control oh adipocyte differentiation. Korean J. Poult. Sci. 26 : 179-188.

Koo, U. S. 2000. The Influence of Egg Immunoglobulin (IgY) on the differention of Adipocyte Precursor Cells of Swine. Thesis of Msc. Konkuk university, Seoul, Korea.

Macdougald, O. A., M. D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu. Rev. Biochem. 64 : 345-373.

MacDougald, O. A., P. Cornelius, R Liu, and M. D. Lane 1995. Insulin negulates transcription of the CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) α,β, and genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. J. Biol, Chem. 270 : 647-654.

Miller, S. C., H. Ito, H. M. Blau and F. M. Torti. 1988. Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. Mol. Cell Biol. 8 : 2295-2301.

Patten, R. L. 1970. The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. J. Biol. Chem. 245 : 5577-5584.

Peter, M., S. Sidney and O. Scow. 1979. J. Biol. Chem. 254 : 10021-10029.

Petruschke, T., H. Hauner. 1993. Tumor necrosis factor
-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. J. Clin. Endocrinol Metab. 76 : 742-747.

Rosen, O. M., C. J. Smith, C. Fung and C. S. Rubin. 1978. Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 253 : 7579-7583.

Shalaby, M. R., B. B. Aggarwal, E. Rinderkecht, P. Svedersky, B. S. Finkle and M. A. Jr. Palladino. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. J. Immun. 135 : 2069-2073.

Sugarman, B. J., B. B. Aggawal, P. E. Hass, I. S. Figori, M. A. Palladino and M. M. Shepard. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230 : 943-945.

Zeng, Q. S., H. Takeyama, S. Kauda and R. F. Irie. 1994. Serum preparation and methods for the large-scale production of IgG monoclonal antibody. Hum. Antibodies Hybridomas 5 : 75-80.

제5장. 항돼지지방세포세포막단백질-IgY유래 Fab` 조각의 기능

제1절 摘要

본 연구는 항돼지지방세포막단백질-IgY와 펩신(pepsin)을 배양하여 얻은 Fab` 조각의 특징과 이것이 돼지지방 전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

전기영동상으로 확인한 펩신과 항돼지지방 막단백질-IgY의 비율(W/W)이 1:10과 1:25펩신 소화물은 59 kDa 부근에서 일정한 밴드가 나타났다. ELISA로 확인한 Fab` 는 항원과 1,024배의 친화력을 보였고 이것은 IgY의 친화력과 같았다. 돼지지방세포막단백질의 전기영동상에 Fab`를 부착(Immunolot)하면 강한 친화력이 있었고 IgY의 Immunolot과 유사하였다. 따라서 항돼지지방 막단백질-IgY의 펩신 소화물은 주로 59.4kDa의 Fab`가 생성된다는 것을 나타내었다. 생산된 돼지지방 전구세포의 분화배지에 Fab`가 함유되면 지방세포전구세포의 증식($p< 0.05$)을 억제하였으며 증식세포수는 MTT의 비색정량으로 확인하였다. 지방세포전구세포를 분화배지에 IgY, Fab(1:10), Fab(1:25), TNF-α 그리고 리놀산을 첨가하여 분화도를 GPDH 활성과 oil red O 염색으로 측정하였다. 지방세포 전구세포의 분화배지에 첨가된 Fab(1:10) 와 Fab(1:25)는 GPDH 활성 억제는 분화배지의 이들값들에 비해서 40%-190%를 억제하였고 첨가된 IgY 같은 효과를 나타내었다. 대조로 분화배지에 첨가된 TNF-α는 GPDH 활성을 억제하였고 리놀산은 GPDH 활성을 증가시켰다. 분화세포에 함유된 지방구의 Oil red O 염색사진도 GPDH 활성과 유사한 경향을 보였다. 따라서 항지방세포막단백질-IgY유래 Fab는 지방세포전구세포의 분화억제역할을 하였다.

본 실험결과는 펩신으로 Fc 조각이 완전히 분해되어 생성된 Fab가 항돼지지방세포막단백질-IgY가 지방세포전구세포에 대하여 같은 경향의 분화억제 효과를 나타내므로 항돼지지방세포막단백질 IgY가 Fc 조각과 보체와의 반응메커니즘이 아닌 다른 메커니즘으로 그 분화억제 효과를 나타낼지도 모른다는 것을 시사하고 있다.

제 2 절 緖論

Hajime 등 (1990)은 채란계의 계란에 측적된 면역글로불린(immunoglobulin:IgY))의 분리는 포유류의 IgG와 같은 작용을 하는 손쉬운 방법이라고 하였다. IgY의 사용방법을 조사하기 위하여 Kim 등(1999)은 항3T3 L1 전구지방세포주-IgY를 생산하여

마우스에 주입하여 마우스의 지방축적량에 미치는 영향을 조사하였다. 항3T3L1-IgY는 조류기원이나 포유류인 마우스의 지방축적량을 감소시킨다는 보고를 하였다. 또한 Koo등(2000)은 다클론 항돼지지방세포 막단백질-IgY는 돼지의 등과 과 복부유래 피하지방의 지방세포 전구세포의 지방세포로의 분화를 억제한다는 것을 발견하였다.

면역글로불린은 disulfide bond가 깨어지면 두개의 Fab 조각과 한 개의 Fc 조각으로 분리된다. Fab 조각은 항원의 Fab 수용체(receptor)와 결합하며 Fc 조각은 항체가 항원에 결합한 후에 생물학적 기능(biological function)을 나타내는 역할을 한다. Mouse (Parham 1983), rat (Rousseaux 등 1983) 그리고 사람 (Eeimer 등 1967)의 면역글로불린을 펴신으로 소화시키면 Fc 족각의 disulfide bond를 분해시키고 두 개의 Fab 조각이 결합된 이량체(bivalent)인 F(ab`)2 조각이 남는다. 그러나 가금의 IgY를 펴신과 배양하면 이량체가 아닌 단량체(monovalent)인 Fab`가 생산된다고 Akita 등(1993)과 Benedict 등(1976)은 발표하고 있다. Akita 등(1993)은 IgY의 분자량은 약 150kDa된다고 하였으며, Akita 등 (1993) 과 Benedict등 (1976)은 Fab` 조각의 분자량은 약 53-59kDa이며 항원 과 Fab 수용체 부분과 결합하는 능력을 가진다고 하였다.

본 연구는 IgY가 돼지지방세포 전구세포의 분화억제에 미치는 작용메커니즘을 조사하기 위하여 돼지지방 막단백질에 대한 가금의 IgY를 펴신소화하여 Fab`조각을 분리하여 그 특징과 돼지지방세포 전구세포의 증식과 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

제3절 材料 및 方法

1. IgY의 작제

가. 막단백질의 추출 과 면역

가락동 소재 농협도축장에서 돼지지방 조직을 37℃ PBS에서 가위로 근육조직과 근섬유 조직을 제거하고 채취된 복부지방조직을 여러 조각으로 나누어 PBS로 수차례 세척하고 제3장 과 제4장에 설명 되어 있는바와 같이 지방세포 세포막 펠렛을 얻었다. 펠렛은 PBS에 현탁하여 막단백질 농도를 측정하고 분주하여 사용시까지 -80℃에 보관하였다.

77주령의 Isa Brown 품종의 갈색 산란계에 100 ug의 돼지지방막단백질이 함유된 PBS 현탁액과 Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)의 유상액을 채란계의 가슴과 다리의 피하에 최초면역하고 그후 4주 간격으로 재면역(boosting)을 실시하였다.

나. IgY의 분리, 정제 및 펴신 분해

면역(Immunization) 후 12주 동안 1주 간격으로 수집한 계란에서 IgY의 분리 및 정제는 제2장, 제3장 및 제4장에 설명하였다. 분리한 IgY펠렛은 PBS에 현탁한 후 투석막내에 넣고, 냉각 PBS를 3시간마다 8번 교체하면서 24시간 투석하였다. 투석후에 펠렛/PBS현탁액은 단백질을 정량하고, 1.5 mL 에펜돌프 튜브에 분주하여 -80℃에 보관하였다.

IgY 10 mg을 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.2)에 용해하여 pepsin : IgY 비율이 1:1(w/w), 1:5, 1:10 그리고 1:25가 되게 동일 buffer에 넣었다. 진탕배양기로 37℃, 48시간 동안 진탕배양하였다. Digestion은 효소가 작용할 수 있는 온도인 37℃에서 9시간동안 수행되었다. Digestion의 결과는 비변성조건 전기영동(non-denaturing condition PAGE)으로 확인하였다.

IgY와 Fab의 친화성측정은 제3장 과 제4장에 설명한 바와 같이ELISA법으로 평가하였다.

2. 전기영동(Electrophoresis)과 Immunoblotting

가. Pepsin 소화된 IgY의 전기영동

항체의 전기영동상은 비변성(non-denaturing) 조건에서 수행되었다. Two Mini Gel (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIO-RAD, America)의 12.5% acrylamide separating gel과 5% acrylamide stacking gel을 만들어 고정하고 전극(electrode)에 gel을 고정하고 유동완충액(running buffer : Tris 3.0 g, Glycine 14.4 g, H_2O 1L, pH 8.8)를 채우고 주사기로 거품을 제거하였다. 5 ug의 항돼지지방막단백질 IgY 와 Fab`를 well에 넣고 100 V로 2시간 통전하였다. 전기영동 후 gel을 분리하여 염색용액(staining solution : Coomassie Blue R-250 0.025%, Methanol 40%, Acetic acid glycial 7%, H_2O 2 L)으로 30분간 valley dancer로 천천히 흔들면서 염색하였다. 30분후 탈색용액(destaining solution : acetic acid glycial 100mL, Methanol 100 mL, H_2O 800 mL)로 배경의 파란색이 모두 없어질 때까지 탈색하였다. 그후 Image Analysing System (BIO-PROFIL, 8617, France, 1998)으로 marker의 이동거리에 대한 RF값으로 단백질 패턴과 분자량을 확인하였다.

나. Pepsin 소화된 IgY의 Immunoblotting

5 ug의 돼지지방세포막단백질을 변성조건(denaturing condition)인 12.5% SDS-PAGE로 단백질을 분리한 후 transfer 장치로 gel을 옮겨 transfer buffer(Tris 3.03 g, glycine 14.4 g, methanol 200 mL, H_2O 1 L로 충분히 적셔둔 membrane을 gel 위에 얹고 pasteur pipette으로 rolling하여 기포를 제거하고 electrode에 장착하여

2시간 통안 100 V의 전류를 통전하여 transfer 하였다. Membrane을 분리하여 panseau 용액(0.1% panceau-S in 5% acetic acid)에 염색하여 단백질의 전이를 확인하고 증류수로 세척하여 panceau-S를 씻어내고 blocking buffer(5% skin milk/TBST(Tris 1.21 g, NaCl 8.7 g H_2O 1 L Tween 20 1 mL)로 2시간 실온에서 blocking 한 뒤 control IgY, IgY against 돼지지방세포막단백질, Fab`(0.5 ug/mL)를 2.5% BSA/TBST 용액에 용해한 후 membrane에 처리하여 2시간 배양하고 TBST로 3회 10분간 세척하였다. 세척후 1% BSA/TBST 용액으로 1000배 희석된 anti-chicken IgG(whole molecule) peroxydase conjugated로 1시간 배양하고 TBST로 10분간 2회 세척하였다. 검출용액(ECL : Enhanced chemiluminesence , western blotting detection reagents, amersham life science, England)를 뿌려준 다음 비닐랩으로 싸서 1분 경과후 암실에서 필름에 감광시키고 auto developer로 현상하였다.

3. 돼지지방세포 전구세포의 배양과 분화

가. 돼지지방세포 전구세포의 분리

20-25 kg의 랜드레이스 수퇘지의 복부 와 등부위 피하지방조직을 채취하여 제3장과 제4장에 설명한바와 같이 지방세포 전구세포를 분리하고 세포수를 세고 배양배지에 현탁한뒤에 각각 직경 10 Cm Petri dish 와 6 well plate (1 X 10^5개/well)에 나누어 37℃, CO_2 5%에서 서 배양하였다. 돼지 혈청은 경정맥에서 채취한 혈액을 4℃, 16-24시간 정치하고 3,000 rpm, 15 분 원심하고 0.2 um 필터로 여과 멸균하고 -20℃에 보관하여 이용하였다.

나. 돼지지방세포 전구세포의 배양 및 분화유도 및 증식도측정

지방세포전구세포는 배양배지에서 3일간 증식 배양하고 시험배지 와 시험배지에 10 ug/mL 인슐린이 함유된 분화배지, 분화배지에 리놀산(linoleic acid), TNF-α IgY 또는 Fab` 조각을 각각 첨가하여 분화를 유도하였다. 분화배양한 지방세포 전구세포의 GPDH 활성을 측정하고 축적된 중성지방을 Oil red O로 염색하고 사진을 촬영하였다. 지방세포 전구 세포의 세포고정과 Oil Red O 염색과 사진 촬영 그리고 GPDH 활성의 측정은 제3장 과 제4장에 설명되어 있다.

지방세포 전구세포의 증식도 측정은 배양배지에 현탁한 돼지지방세포전구세포의 농도를 10^4/mL로 하고 100ul/well를 96well tissue culture plate에 넣고 37℃와 5% CO_2에서 24시간 배양하고 insulin, TNF-α, linoleic acid, IgY, 혹은 Fab` fragment가 함유된 배양배지에서 44시간 배양하고 20 uL의 MTT(5 mg/mL)을 넣고 4시간 더배양하고 배양액을 제거하고 100 ul의 solvent(DMSO:ETOH, 1:1)를 넣어 formazan blue를 용해시키고 570 nm에서 reference를 630 nm로 하여 흡광도를 측정하였다.

4. 통계분석

실험에서 얻어지 값들은 SAS (SAS Institude, Cary, NC, 1988)의 GLM 프로그램으로 분산 분석하고, Duncan의 다중 검정법 또는 Student's t 값으로 실험 값사이의 유의차를 검정하였다.

제3절 結果 및 考察

가. 펩신(Pepsin)의 농도와 항체의 분해

펩신으로 소화시킨 IgY의 전기영동상을 Figure 1에 나타내었다. 첫 번째 선로(lane)(1)에는 단백질 분자량측정 표준물질 (marker), 두 번째 선로(2)에는 완전한 항지방세포 막단백질 IgY의 전기영동상을 나타내었다. 그리고 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 및 여섯번째 선로(3)에는 펩신과 IgY의 비율을 각각 1:1(w/w), 1:5, 1:10, 그리고 1:25로 혼합하여 37℃에서 9시간 동안 반응 시 생성된 IgY 단백질 조각의 전기영동상을 나타내었다.

세 번째 선로에 나타난 바와 같이 펩신과 IgY를 동량(1:1)으로 혼합하여 37℃에서 9시간 배양하면 두 번째 선로에 있는 완전한 IgY의 분리된 띠나 펩신과 IgY를 1:5, 1:10 또는 1:25의 농도를 배양한것의 선로들과 비교하였을 때에 특징적인 띠가 출현하지 않았다. 펩신과 IgY를 동량으로 반응시키면 일부 분리된 띠들이 분자량 59kDa 이상과 이하에 걸쳐 나타났다. 이것은 펩신에 의해 Fab` 조각 및 Fc 조각까지 모두 무작위로 분해되어 여러 가지 분자량의 단백질이 나타난 것이라 생각된다. 이 러한 성적은 IgY의 양에 비해서 펩신의 양이 많으면 IgY의 분해되는 부위가 일정하지 않다는 것을 나타내는 것 같다.

펩신과 IgY가 1:5 비율(네 번째 선로)로 첨가되어 9시간 배양하면 59.4kDa에서 특징적인 띠가 분명하게 나타났다. 다섯 번째와 여섯 번째 선로인 펩신과 IgY를 1:10 혹은 1:25 비율로 혼합하여 배양한것에서는 59kDa에서 더 명확한 띠가 나타났다.

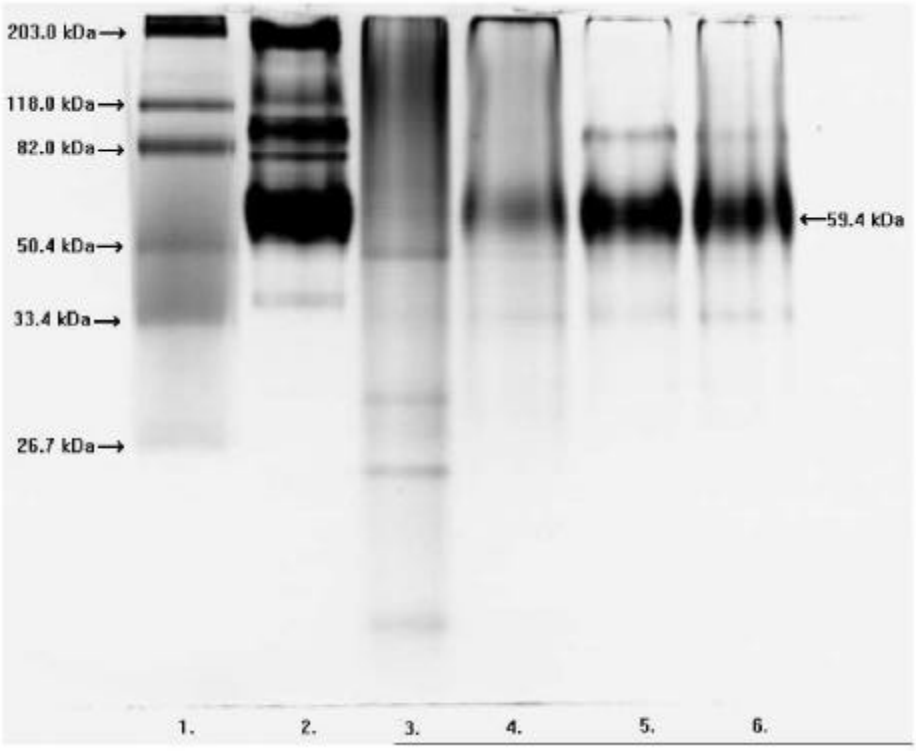
가금의 IgY는 포유류의 IgG와는 구조적인 차이가 있다. 특히 가금의 IgY의 H chain은 포유류의 γ-chain과는 다른 중요한 차이를 보인다(Leslie 등 1969, Benedict 등 1976). Pavari 등(1988)에 의하면 가금의 Cγ는 포유류의 Cε과 비교하여 분자량에 기준하여 4개의 CH domain과 흡사하다고 하였다. 그리고 가금의 IgY에는 hinge region이 관찰되지 않았다고 보고하였다. Pavari 등(1988)은 가금의 IgY에는 hinge region이 없어서 포유류의 IgG와는 달리 F(ab`)2 fragment가 펩신에 의해 소화되는 부분이 있다고 하였다.

Akita등(1993)과 Benedict(1976)등은 가금의 IgY를 펩신으로 소화했을 때 Fab`

fragment의 분자량은 약 52-59 kDa 이라고 하였다. 본실험의 59 kDa에 나타난 띠는 F(ab`)2 조각이 펩신에 의해 분해, 생성된 Fab` 조각이라고 생각되었다.

다섯 번째 선로인 펩신과 IgY가 1:10의 비율로 하여 배양했을 때는 분자량이 59 kDa 보다 큰 띠도 희미하지만 함께 나타났다. 여섯 번째 선로인 펩신과 IgY가 1:25에서는 이러한 띠가 보이지 않았다. 펩신과 IgY를 1:10으로 혼합하여 배양한 것에서는

Figure 1. Non-denaturing electrophotometric profile of Fab` from the IgY digested by pepsin



Marker 0 : 0 1 : 1 1 : 5 1 : 10 1: 25 Pepsin:IgY(w/w)

Pepsin and whole IgY in 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.2) was incubated with shaking at 37℃ for 9hr.

59.4kDa 보다 높은 분자량에서 희미하게 나타난 띠는 펩신에 의해서 분해되지 않은 더 큰 분자량의 IgY 조각을 나타낸다. 따라서 펩신과 IgY를 1:25로 혼합하여 배양한 것에서 더 균일한 분자량의 IgY가 나타났으며, 이 단백질의 분자량은 59.4kDa 이 된다는 것을 가리키고 있다.

본 실험에서는 펩신과 항체의 비율을 1:25로 하여 37℃에서 9시간 배양하여 얻어진 결과를 이용하여 다른 실험들이 진행되었다. 그러나 펩신과 항체의 비는 생물활성의 존재여부에 의하여 결정돼야 한다고 생각된다.

나. 생산된 Fab` fragment의 역가

Figure 2에는 돼지지방세포막단백질에 대한 항돼지지방막단백질 IgY와 펩신 소화된 Fab` 조각의 역가를 ELISA법으로 측정한 결과를 나타내었다. Figure 2는 IgY의 항원과의 반응성은 Fab` fgragment의 항원과의 반응성과 비슷한 유형이라는 것을 설명하고 있다. IgY와 Fab` 조각의 지방세포막단백질에 대한 반응은 유사하였으며 최소반응역가는 1,024배 희석 배율에서 나타났다. 이것은 31 ng의 IgY 또는 Fab` 조각에 상당하였다.

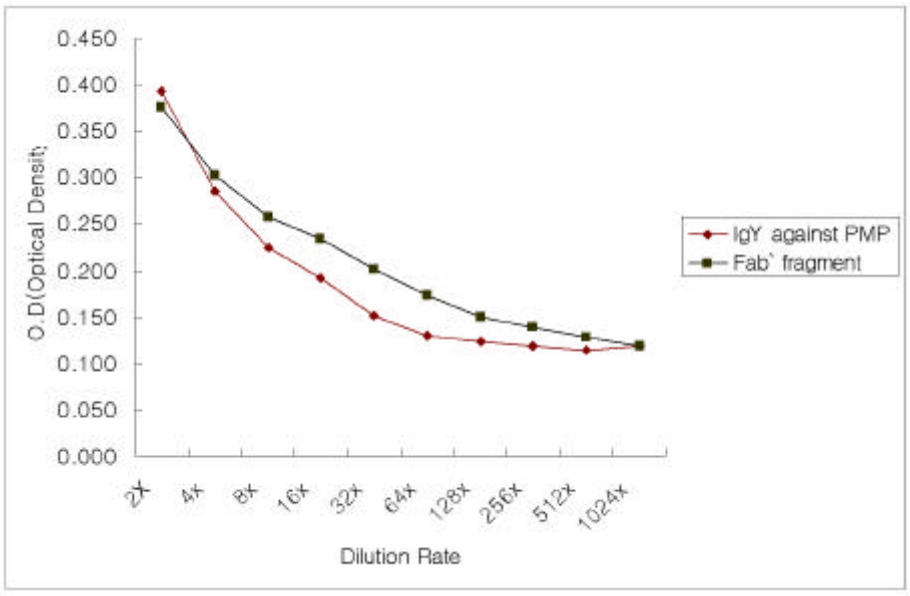
김(1998)등은 본 실험실에서 항지방세포전구세포(preadipocyte) 세포주(3T3-L1) 항체를 채란계의 계란 난황으로부터 분리하여 역가를 조사하였다. 지방세포전구세포 세포주(3T3-L1)에 대한 항체의 역가는 20배 희석배율까지 높은 역가를 보였고 최소역가는 1,000배 희석까지였다. 이 실험에서 작제된 항체는 porcine serum이 함유된 배지에서 지방전구세포의 분화를 억제하는 결과를 얻었다. 이 결과는 지방전구세포주(3T3-L1)에 대한 항체의 생산과 항체의 작용을 통해 면역학적 방법으로 체내 지방축적조절의 모델을 확립할 수 있다는 것을 시사하였다.

Koo등 (1999)은 본 실험실에서 항 돼지지방 막단백질 IgY의 돼지지방막단백질과의 역가를 조사하였다. IgY와 돼지지방전구세포와의 역가는 16배까지 높은 반응성을 보였으며 최소반응역가는 64배 희석까지였으며 이 항돼지지방막단백질 IgY가 돼지지방전구세포의 분화를 억제한다는 것을 TNF-α, 리놀랜산(renoleic acid) 그리고 노르에피네프린(norepinephrine)등의 억제현상과 비교하여 관찰하였다.

또한 임(2000)은 본 심험실에서 채란계에서 항돼지지방세포막단백질 항체와 항돼지지방세포막백질 토끼혈청을 분리 및 정제한 IgG를 항원으로 하여 생산된 IgY(Idiotype IgY)를 각각 분리 정제하여 ELISA법으로 친화성을 조사하였다. 항돼지지방막단백질 IgY의 반응성은 32배 희석인 312 ng 까지 나타났으며, idiotype IgY의 반응성은 512배 희석농도인 2.0 ng 까지 나타났으며 이 두가지 항체의 지방세포전구세포에 대한 분화억제를 TNF-α와 비교, 관찰하여 지방세포 전구세포의 분화에 IgY가 관여할 것이라는 결과를 얻었다.

따라서 본 실험에서 분획한 Fab` 조각으로 추정되는 59.4kDa의 단백질 조각의 돼지지방세포전구세포에 대한 반응성이 1.024배 희석농도인 31 ng 까지 나타났다는 것은 Fab`가 IgY와 유사한 생물활성을 나타낼 가능성이 있다는 것을 시사하였다.

Figure 2. Affinity of Fab` derived from the anti-porcine adipocyte plasma membrane protein-IgY by pepsin

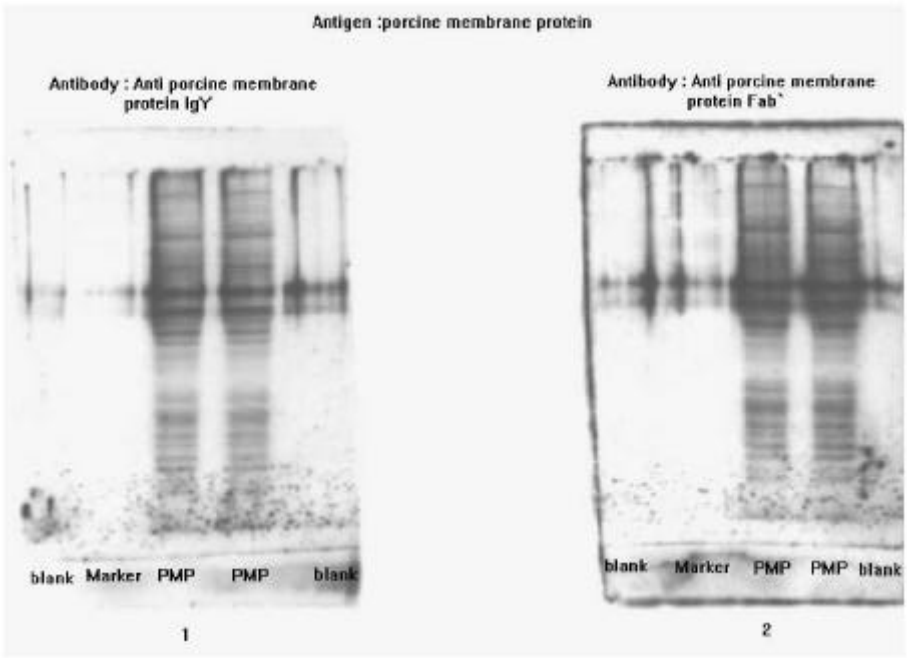


PMP : Porcine adipocyte plasma membrane protein

다. 지방세포막단백질에 대한 Fab` **조각의** Immunoblotting

돼지지방세포막단백질을 전기영동하여 여기에 IgY **또는** Fab`**를 반응시키고 다시** ECL**을 부착하여 전자방사**(electron emission)**를 촬영한 사진을** Figure 3**에 나타내었다.** IgY**와** Fab` **조각 모두 돼지지방세포막단백질 모든 부분에 강하게 부착하여 검은색으로 진하게 나타났다. 이것은 생성된** IgY**와** Fab` **조각 모두 돼지지방세포막의 여러 가지 단백질과 잘 반응하면 이들 단백질 이 항원으로 작용하여** IgY**가 만들어졌다는 것을 나타내었다.** Kestin(1993)**등은 돼지지방 세포막단백질을 항원으로 하여 양으로부터 얻은** serum**으로** immunoblot**을 실시한 결과 매우 강한 결합력을 가지며 부착된다는 것을 확인한바 있다.**

Figure 3. Photograph of immunoblotting of porcine adipocyte plasma membrane protein reacted with anti membrane protein-IgY and Fab` fragment from the IgY



1 : Anti- porcine adipocyte plasma membrane protein-IgY
2 : Fab' from the Anti- porcine adipocyte plasma membrane protein-IgY
PMP : porcine adipocyte plasma membrane protein

라. Fab'의 지방세포 전구세포 증식에 미치는 영향

돼지지방세포전구세포의 증식에 미치는 Fab`의 작용을 Table 1에 나타내었다. 등지방과 복부지방에서 분리한 지방세포전구세포 증식시에 Fab`를 well당 0.125 ug 으로부터 1.00 ug 까지 첨가하였다. 증식도는 MTT를 배양용액에 첨가하여 생성되는 formazan blue 색상의 농도의 변화로 나타내었다. Fab`가 1.00 ug/well 로부터 2배수 연속희석하여 0.0 ug/well 까지 첨가되면 Fab`의 농도가 감소함에 따라 복부와 등지방조직의 지방세포전구세포에서 OD값이 유의하게 높아졌다($p<0.05$). 이것은 돼지등지방전구세포의 증식이 Fab`의 농도가 감소함에 따라 증가하여 Fab`를 배양배지에 첨가하면 돼지지방전구세포의 증식이 억제되었다.등지방에서 취한 지방세포전구세포에 비해서 복부지방에서 취한 것은 OD값이 높았다. 이것은 복부지방의 전구세포의 증식율이 높다는 것을 의미한다. 그리고 OD값이 낮다는 것은 실험에 사용한 세포의 숫자가 적은 것이 그 원인이라고 생각된다. 따라서 다음실험에서는 세포의 숫자를 늘려서 증식에 미치는 Fab`의 영향을 관찰할 필요가 있을 것이다. Figure 1, 2 및 3에서 전기영동상, 역가 및 immunoblot을 통해 그 특성을 조사한바 일치하였다. 따라서 본 성적은 본 실험에서 조제한 Fab`가 지방세포 전구세포의 증식을 억제하여 있다는 것을 나타내었다. Koo(1999)등은 본실험실에서 IgY가 돼지지방전구세포의 분화를 억제한다는 것을 보고하였다. IgY유래의 Fab` 조각이 돼지지방전구세포의 증식의 억제가 돼지지방전구세포의 분화 억제와 동일한 메카니즘에 의한것인지는 확인되지 않았다.

Table 1. Function of the Fab` in the differentiation medium on the proliferation of back and abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells.

Fab`	Abdominal	Back
ug/well	Optical density	
1.000	0.05113c ± 0.00807	0.00563e ± 0.00192
0.500	0.05850bc± 0.00730	0.01425d ± 0.00233
0.250	0.06300bc± 0.01249	0.01888c ± 0.00341
0.125	0.06413b ± 0.01194	0.02663b ± 0.00353
0.000	0.08500a ± 0.01568	0.03013a ± 0.00169
LSD	0.003	0.0125

Values are the mean ± SD of 8 replicates.

Means with different superscript in the same column are different at $p < 0.05$.

Adipocyte precursor cells 103 / well in differentiation medium containing 10% FBS and Fab` were incubated at 37℃, 5% CO2 for 72hr.

마. 돼지지방전구세포의 분화와 Fab`의 작용

1). GPDH 활성에 미치는 Fab 와 IgY의 영향

돼지의 복부 및 등 피하조직의 지방세포 전구세포를 시험배지와 시험배지에 10ug/mL의 인슐린을 첨가한 분화배지, 분화배지에 IgY, Fab, TNF-α 그리고 리놀산을 첨가하여 분화유도 된 세포의 GPDH 활성을 각각 나타내었다.

분화유도한 세포의 GPDH 활성은 분화배지에 IgY(Table 2)를 첨가하면 분화배지에 비하여 낮은값을 나타내었다. 분화배지에 Fab를 첨가했을때(Table 3 및 Table 4)도 분화배지에 비하여 최저 40% 최고 190%정도의 GPDH활성을 감소시켰다.

임(2000)등과 구(1999)등이 보고한 바에 의하면 항돼지지방세포막단백질 IgY는 지방세포전구세포의 분화유도시 GPDH 활성을 낮춘다고 하였다.

Table 2. Function of anti-porcine adipocyte plasma membrane protein-IgY1) in differentiation medium on the GPDH activity in abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells

Insulin	IgY	Abdomianl		Back	
ug/mL		nmol/mg/min2)	Index	nmol/mg/min2)	Index
0.0	0.0	169±120	100±00	189±2	100±00
10.0	0.0	421±129	249±77	343±156	181±84
10.0	0.5	157±48	93±28	267±136	141±73
10.0	1.0	97±95	57±56	96±35	80±23

Values are the average of 2 pigs

1) Adipocyte precursor cells were incubated in the plating medium for 24hr and then incubated in test medium containing 2.5% porcine serum, 0.25% dexamethasone 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin(IBMX) or differentiation medium and differentiation medium containing IgY for 2 days.

2) NADH nmol/mg/min.

Table 3. Function of Fab`1)(1:10,w/w) from anti-porcine adipocyte plasma membrane protein IgY in differentiation medium on the GPDH activity in abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells

Insulin	Fab(1:10)	Abdomianl		Back	
-ug/mL-		nmol/mg/min2)	Index	nmol/mg/min2)	Index
0.0	0.0	660	100	161	100
10.0	0.0	812	123	342	212
10.0	0.5	430	65	157	98
10.0	1.0	300	45	133	83

Values are the average of 1 pig

1) Adipocyte precursor cells were incubated in the plating medium for 24hr and then incubated in differentiation medium containing Fab(1:10) for 2 days.

2) NADH nmol/mg/min

Table 4. Effect of Fab (1:25,w/w) from anti-porcine adipocyte plasma membrane protein IgY on the GPDH activity in abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated in differentiation medium1)

Insulin	Fab(1:25)	Abdomianl		Back	
-ug/mL-		nmol/mg/min2)	Index	nmol/mg/min2)	Index
0.0	0.0	298±312	100±00	184±61	100±00
10.0	0.0	544±358	162±45	591±119	345±137
10.0	0.5	119±122	73±55	305±152	152±58
10.0	1.0	92 ±118	38±23	129±39	73±23

Values are the average of 4 pigs±SD.

1) Adipocyte precursor cells were incubated in the differentiation medium containing Fab(1:25,w/w) for 2 days.

2) NADH nmol/mg/min.

1) GPDH 활성에 미치는 지방생합성 억제 및 촉진제의 영향

돼지의 복부 및 등 피하조직의 지방세포 전구세포를 시험배지와 시험배지에 10ug/mL의 인슐린을 첨가한 분화배지, 분화배지에 TNF-α 또는 리놀산을 첨가하여 분화유도 된 세포의 GPDH 활성을 조사하였다.

돼지지방세포전구세포의 분화배지중의 TNF-α가 GPDH 활성에 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. 복부 및 지방세포전구세포의 GPDH 활성은 분화배지에 TNF-α 0.5 또는 2.0 ng/mL 함유되면 인슐린이 함유되지 않은 것에 비해서도 42 ~ 52%가 감소하였다. 그러나 동일한 조건인 분화배지와 비교하면 활성을 190-250%감소시켰다. 그러나 등지방세포전구세포의 배양은 자돈1두에서만 실시되었으므로 실험예수를 증가할 필요가 있을 것이다. Tony 등(1989)은 특정 종양세포에서 TNF-α는 세포독성이 있는 단백질로서 지방전구세포의 지방세포로의 분화를 억제한다고 하였다. Torti(1985)등은 TNF-α가 지방세포의 유전자 발현을 억제하여 지방세포의 분화를 억제한다고 보고하였으며, Bei 등(1996)은 TNF-α가 3T3L-1 세포주에 대하여 antiadipogenic effect가 있다고 보고하였다. 사람의 지방세포 전구세포의 지방세포로의 분화에대한 TNF-α의 억제효과에 대한 연구는 Ptrruschke 등(1993)이 하였다.

본 연구의 성적은 돼지의 복부지방세포전구세포의 분화를 TNF-α가 억제하고 있다는 것을 나타내었다.

Table 5. Effect of TNF-α in the differentiation medium1) on the GPDH activity in abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells

	Insulin	TNF-α	Abdomianl		Back	
	ug/mL	ng/mL	nmol/mg/min2)	Index	nmol/mg/min2)	Index
Test	0.0	0.0	567±633	100	546	100
Diffferentiation	10.0	0.0	1198±1036	318±303	1267	232
	10.0	0.5	257±293	49±13	282	52
	10.0	2.0	282±385	45±19	231	42

Values are the average of 3 pigs±SD in abdominal and 1 pig in back.
1) Adipocyte precursor cells were incubated in the differentiation medium containing TNF-α for 2 days.
2) NADH nmol/mg/min

지방세포 전구세포의 분화배지에 첨가한 리놀산이 GPDH 활성에 미치는 영향을

Table 6에 나타내었다.

분화배지에 2 uM의 리놀산이 함유되면 복부 및 등 지방 모두 대조구인 인슐린만 첨가된 구에 비하여 높은 GPDH 활성을 나타내었다. 0.5uM의 인슐린이 함유되어도 등지방에서는 인슐린만 함유된 분화배지에 비하여 높은 GPDH 활성을 보였다. 따라서 본연구는 리놀산이 지방세포 전구세포의 분화를 자극한다는 것을 나타내고 있다.

Table 6. Effect of linoleic acid(C18:2) on the GPDH activity in abdominal and back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated in differentiation medium1)

Isulin	C18:2	Abdomianl		Back	
ug/mL	uM	nmol/mg/min2)	Index	nmol/mg/min2)	Index
0.0	0.0	208±175	100	162±6	100
10.0	0.0	515±387	215±92	251±32	154±21
10.0	0.5	243±157	118±30	347±239	216±153
10.0	2.0	525±232	361±249	747±607	463±387

Values are the average of 3 pigs±SD

1) Adipocyte precursor cells were incubated in the differentiation medium containing linoleic acid for 2 days.

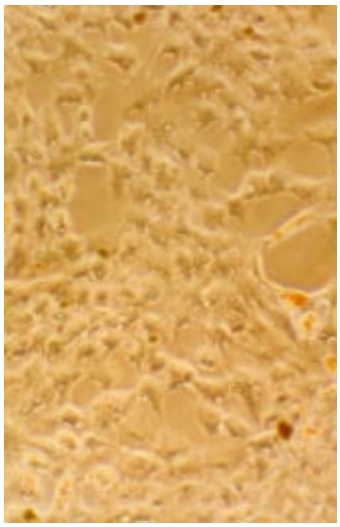
2) NADH nmol/mg/min

3) **지방구의** Oil red O **염색**

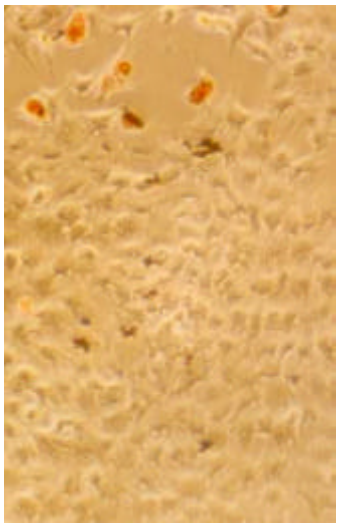
가) 분화배지중 IgY **와** Fab**첨가**

분화배지에 IgY**가 첨가되면 복부지방세포전구세포**(Photo 1)**와 등지방세포전구세포**(Photo 2)**의 분화시의 지방의** Oil Red O **염색사진은** Table 2**의** GPDH **활성을 뒷바침하였다**. Photo 3**에는 복부지방세포전구세포를** Fac(1:25)**가 함유된 분화배지에서 배양한것과** Photo 4**에는 등지방세포전구세포의** oil red O **염색사진을 나타내었다**.

Photo 1. Photograph(100×) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with anti-pocine adipocyte plasma membrane protein-IgY.



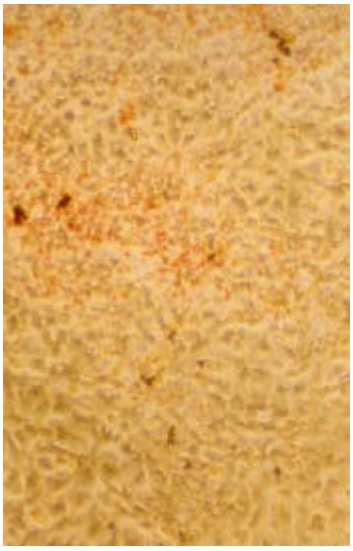
0.5 ug IgY



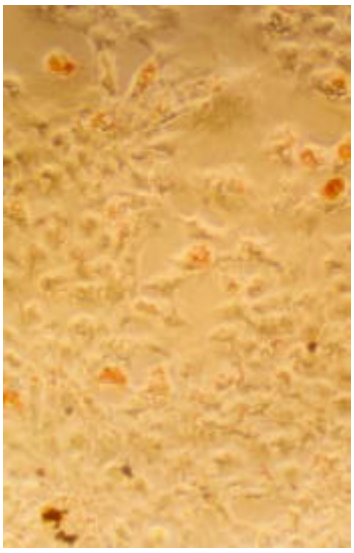
1.0 ug IgY

Photo 2. Microscopic(100×) pictures of back subcutaneous adipocyte precursor cells

incubated with anti-pocine adipocyte plasma membrane protein IgY.

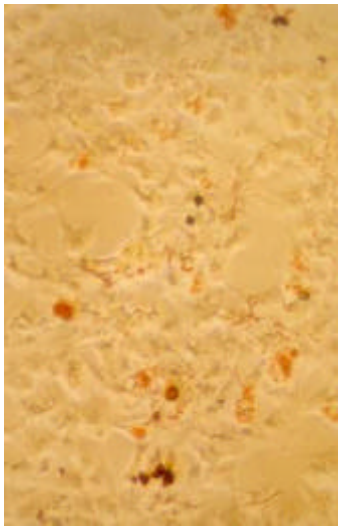


+Insulin

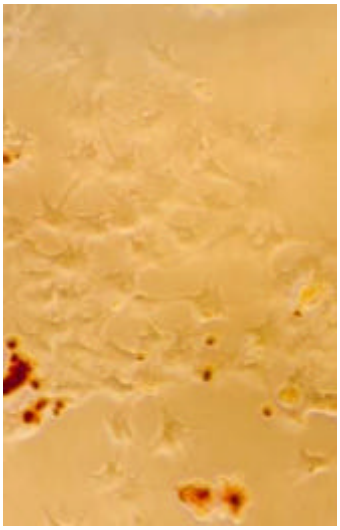


- Insulin

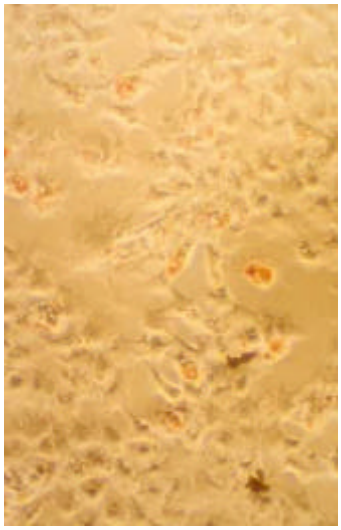
Photo 3. Photograph(100×) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with the Fab(1:25, w/w)



+Insulin



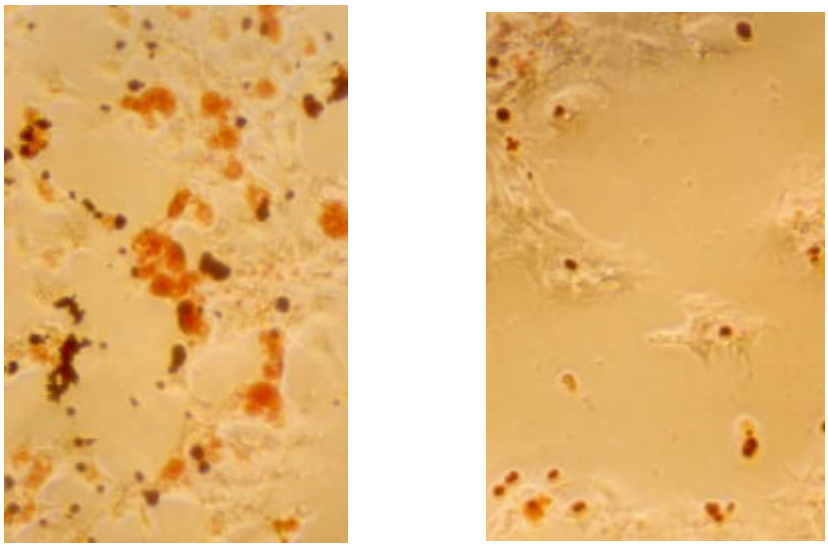
- Insulin



0.5 ug Fab

1.0 ug Fab

Photo 4. Photograph(100×) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with Fab(1:25 w/w)



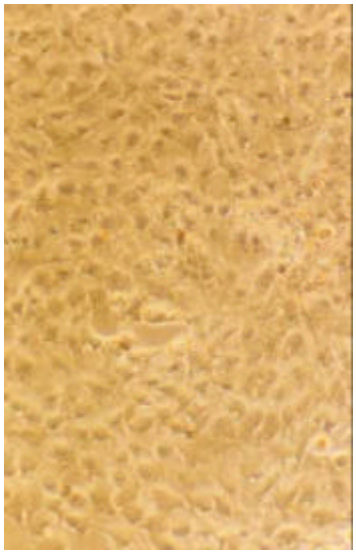
+Insulin　　- Insulin

나) 분화배지 중 지방생합성 억제 및 촉진제 첨가

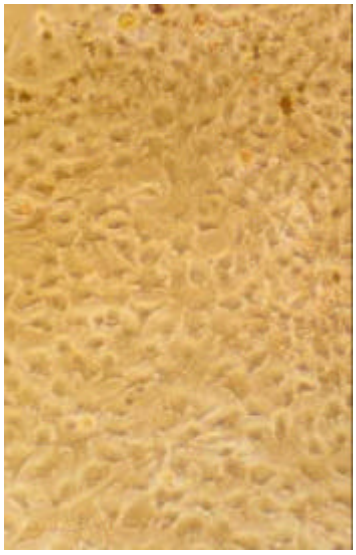
Photo 5에는 복부지방세포전구세포를 분화배지에서 배양할때 여기에 TNF-α를 첨가하여 배양한것의 사진이고, Photo 6에는 등지방전구세포의 분화유도시에 TNF-α를 첨가하여 oil red O 염색하여 촬영한 사진이다. Photo 7은 복부지방세포전구세포의 분화유도시에 리놀산을 첨가하여 배양한 세포, 그리고 Photo 8은 등지방전구세포의 oil red O 염색하여 촬영한 사진이다.

Photo 5. Photograph(100×) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with diffrentiation medium containing 0.5 and 2.0 ng/mL of TNF-α

Photo 6. Photograph(100×) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with diffrentiation medium containing 0.5 and 2.0 ng/mL of TNF-α



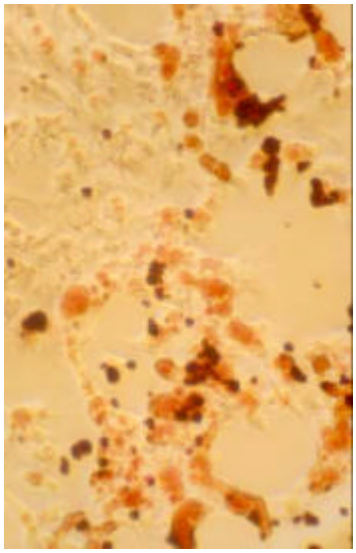
0.5 ng TNF-α



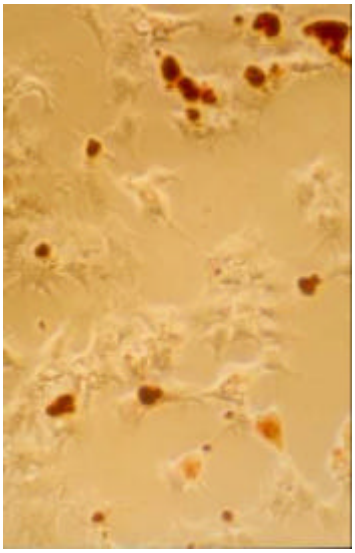
2.0 ng TNF-α

Photo 7. Photograph(100×) of abdominal subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with 1,0 and 2.0 uM of linoleic acid

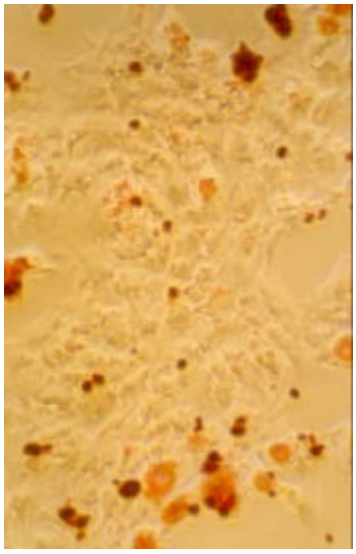
Photo 8. Photograph(100×) of back subcutaneous adipocyte precursor cells incubated with 1,0 and 2.0 uM of linoleic acid



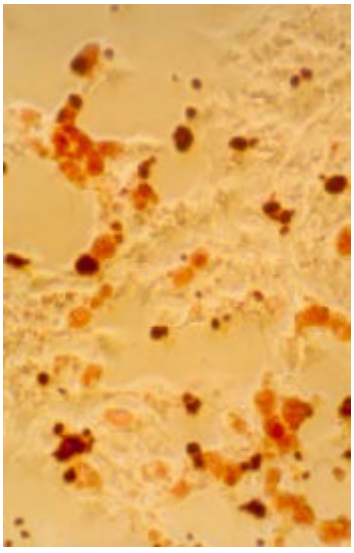
+Insulin



- Insulin



1.0 uM linoleic acid



2.0 uM linoleic acid

제5절 參考文獻

Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J. Food Sci. 57 : 629-634.

Baile, C. A., C. L. McLaughlin, F. C. Buonomo, T. J. Lauterio, L. Marson and M. A. DellaFerra. 1987. Opioid Peptides and the control of feeding in sheep. Fed. Proc. 46 : 173-177.

Bei Zhang, Joel Berger, Erding Hu, Deborah Szalkowski, Sylvia White-Carrington, Bruce M. Spiegelman, and David E. Moller. 1989. Negative Regulation of Peroxisome Proliferator-Acticated Receptor-γ Gene Expression Contributes to the Antiadipogenic Effects of Tumor Necrosis Factor α

Benedict, A.A. and Yamaga, K. (1976) Immunoglobulin and antibody production in avian apesies. In : J.J. Marchalonis(Ed.), Comparative Immunology. Blackwell Scientific Puplications, Oxford, PP. 335.

Borensztain, D., R. J. Salmols and A. H. Rubenstein. 1972. Effects of insulin on lipoprotein lipase activity in the rat heart and adipose tissue. Am. J. Physiol. 223 : 1271-1275.

Burd, R. S., C. S. Raymond, C. A. Ratz and D. L. Dunn. 1993. A rapid procedure for `purifying IgM monoclonal antibodies from murin ascites using a DEAE-disk. Hybridoma 12 : 135-142.

Butterwith, S. C., S. Kestin, H. D. Griffin and D. J. Flint. 1989. Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors: lack of tissue specificity. Br. Poult. Sci. 30 : 371-378.

Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and Williamson, B. D. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 72 : 3666-3670.

Cryer, A., S. E. Riley, E. R. Williams and P. S. Robinson. 1976. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations. Clin. Sci. Mol. Med. 50 : 213-221.

Cushman, S. W. and L. J. Wardizala. 1980. Potential mechanism of insulin action

on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 255 : 4758-4762.

De Clercq, L., J. Mourot, C. Genart, V. Davidts, C. Boone and C. remacle. 1997 An Anti-Adipocyte Monoclonal Antibody is Cytotoxic to Porcine Preadipocytes in vitro and Depresses the Development of Pig Adipose Tissue. J. Anim. Sci. 75 1791-1797.

Dong J., D. P. Froman and C. Y. Hue. 1991. Development and characterization of polyclonal antibodies against chicken adipocytes. Comp. Biochem. Physiol. A. 99 195-198.

Dulor, J. P., Y. Reyne, and J. Nougues. 1990 In vivo effects of a treatment with antibodies to adipocyte plasma membranes in the rabbit. Reprod. Nutr. Dev. 30 : 49-58.

Figlewicz, D. P., M. Schwarz, R. Seeley, M. Chavez, D. Baskin, S. Woods and D. Porte. 1996. Endocrine regulation of food intake and body weight. J. Lab. Clin. Med. 127 : 328-332. Flint, D. J., H. Coggrave, C. E. Futter, M. J. Gardner, and T. J. Clarke. 1986. Stimulatory and cytotoxic effects of an antiserum to adipocyte plasma membranes on adipose tissue metabolism in vitro and in vivo. Int. J. Obesity 10 : 69-77.

Forbes, J. M. 1985. Similarities and differences between intake control mechanisms in pigs, chickens and ruminants. Proc. Nutr. Soc. 44 : 331-338.

Futter, C. E. and D. J. Flint. 1990. Endocrinological and immunological manipulation of adipocyte. In: J. M. Forbes and G. R. Hervey (ED.) The control of body fat content. p 87. Smith-gordon, London.

Goodman, M., H. R. Wolfe and S. Nortan. 1951. Precipitin production in chickens. VI. The effect of varying concentrations of NaCl on precipitate formation. Journal of Immunology 66 : 225-236.

Hajime Hatta, Mujo Kim and Takehiko Yamamoto. 1990 A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". agric. Biol. Che.m 54(10), 2513-2535

Helson, L., S. Green, E. A. Carswell and L. J. Old. 1975. Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature 258 : 731-732. Hervey, G. R. 1959. The effect of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. J. Physiol. 145 : 336-352.

Hervey, G. R. (1959). The effect of lesions in the hyphothalamus in parabiotic rats. J. Physiol.(London) 145, 336-352

Houpt, T. R. 1985. The physiological determinants of meal size in pigs, Proc. Nutr. Soc. 44 : 323-330.

James, D. E., M. Strube and M. Mueckler. 1989. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. Nature 338 : 83-87.

Karlsson, F. A., C. Grunfeld, C. R. Kahn and J. Roth. 1979. Regulation of insulin receptors and insulin responsiveness in 3T3-L1 fatty fibroblasts. Endocrinology 104 : 1383-1392.

Kennedy, G. R. (1950). The hypothalamic control of food intake in rats. Proc. R. Soc.(London), Ser. B 137, 535-549

Kestin, S., R. Kennedy, E. Tonner, M. Kiernan, A. Cryer, H. Griffin, S. Butterwith, S. Rhind and D. Flint. 1993. Decrease fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membrane. J. Anim. Sci. 71 : 1486-1494.

Kim, S. Y., S. G. Hang, U. S. Koo and T. S. Koh. 1999. The production of egg yolk immunoglobulin (IgY) raised against 3T3L-1 cell membrane protein and the control on adipocyte differentiation. Korean J. Poult. Sci. 26 : 179-188.

Koo, U. S. 2000. The Influence of Egg Immunoglobulin (IgY) on the differention of Adipocyte Precursor Cells of Swine. Thesis of Msc. Konkuk university, Seoul, Korea.

Kuri-Harcuch, W., L. S. Wise, and H. Green. 1978. Interruption of the adipose conversion of 3T3 cells by biotin deficiency : differentiation without triglyceride ccumulation. Cell 14 : 53-59.

Mackall, J. C., A. K. Student, S. E. polakis and M. D. lane. 1976. Induction of lipogenesis during differentiation in a "preadipocyte" cell line. J. Biol. Chem. 251 6462-6464.

Macdougald, O. A., M. D. Lane. 1995. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annu. Rev. Biochem. 64 : 345-373.

MacDougald, O. A., P. Cornelius, R Liu, and M. D. Lane 1995. Insulin regulates transcription of the CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) α, β, and genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. J. Biol, Chem. 270 : 647-654.

Miller, S. C., H. Ito, H. M. Blau and F. M. Torti. 1988. Tumor necrosis factor

inhibits human myogenesis in vitro. Mol. Cell Biol. 8 : 2295-2301.

Moloney, A. P. and P. Allen. 1989. Growth and weights of abdominal and carcass fat in sheep immunized against adipose cell membrane. Proc. Nutr. Soc. 48 14A. Old, L. J. 1985. Tumor necrosis factor (TNF). Science. 230 : 630-632.

Patten, R. L. 1970. The reciprocal regulation of lipoprotein lipase activity and hormone-sensitive lipase activity in rat adipocytes. J. Biol. Chem. 245 : 5577-5584.

Pavari, U., Aivivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y. and Schechter, I. (1988) Checken immunoglobulin γ-heavy chains : limited VII gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. EMBO J 7, 739

Peter, M., S. Sidney and O. Scow. 1979. J. Biol. Chem. 254 : 10021-10029.

Petruschke, T., H. Hauner. 1993. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. J. Clin. Endocrinol Metab. 76 : 742-747.

Roche, J. F. and J. F. Quirke. 1986. The effects of steroid hormons and xenobiotics on growth of farm animals. Control and Manipulation of Animal Growth. 39-65.

Rosen, O. M., C. J. Smith, C. Fung and C. S. Rubin. 1978. Development of hormone receptors and hormone responsiveness in vitro. Effect of prolonged insulin treatment on hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes. J. Biol. Chem. 253 : 7579-7583.

Shade, R., C. Stake and D. Strangham 1996. the production of avain (egg yolk) antibodies : IgY : ATLA 24 : 925-934.

Shalaby, M. R., B. B. Aggarwal, E. Rinderkecht, P. Svedersky, B. S. Finkle and M. A. Jr. Palladino. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. J. Immun. 135 : 2069-2073.

Smith, L. C., R. O. Scow. 1979. Chylomicrons. Mechanism of transfer of lipolytic products to cells. Prog. Biochem. Pharmacol. 15 : 109-138.

Stephens, J. M. and P. H. Pekala. 1992. Transcriptional repression of the C/EBP-α, and GLUT 4 genes in 3T3L1 adipocytes by TNF-α. J. biol. Chem. 267 : 13580-13584.

Sugarman, B. J., B. B. Aggawal, P. E. Hass, I. S. Figori, M. A. Palladino and M.

M. Shepard. 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha : Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230 : 943-945.

Tony R. Reid, Frank M. Torti, and Gordon M. Ringold 1989. Evidence for tow mechanisms by which toumor necrosis factor kills cells. The Jounal of Biological Chemistry vol. 264 : 4583-4589

Torti, F. M., B. Dickman, B. Beutler, A. Cerami and G. M. Ringold. 1985. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression : an in vitro model of cachexia. Science 229 : 867-869.

Vernon, R. G. and R. A. Clegg. 1985. In new perspectives in adipose tissue: structure, function and developement, (A. Cryer and R. L. R. Van), p. 65-86. London.

Vilcek, J., V. J. Palombella, D. Henriksen-Destefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto. 1986. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. J. Exp. Med. 163 : 632-643.

Warries, P. D., S. C. Kestin and S. N. Brown. 1989. The effect of beta-adrenergic agonists on carcass and meat quality in sheep. Anim. Prod. 68 : 128.

Wise, L. S. and H. Green. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerol phosphate dehydrogenase in adipose conversion of 3T3L1 cells. J. Biol. Chem. 254 : 273-275

Woods, S. C., R. Saaley, D. Porte, and M. Schwartz. 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280 : 1378-1383.

Zeng, Q. S., H. Takeyama, S. Kauda and R. F. Irie. 1994. Serum preparation and methods for the large-scale production of IgG monoclonal antibody. Hum. Antibodies Hybridomas 5 : 75-80.

제6장 사료중첨가된 IgY에 대한 자돈에서의 항IgY혈청 생산

제1절 적요

지방세포 전구세포의 분화를 In vitro에서 항지방세포막단백질IgY가 억제하였으므로 이 IgY의 산업적 이용을 목적으로 in vivo에서 항체와 담체 혼합물이 함유된 사료급여시의 항-IgY혈청이 생성되는지에 대하여 확인하였다.

IgY 또는 IgG와 담체1 또는 담체2 혼합물이 함유된 사료를 급여하여 부로일러에서의 모델실험을 실시하고 그결과를 바탕으로 자돈에서 IgY 와 담체1 또는 담체2 혼합물이 함유된 사료를 급여하여 모델실험을 실시하였다.

담체의 스크리닝을 위한 모델로 항체 또는 담체에 대한 항혈청 생성되는지 부로일러에 담체1 또는 담체2와 IgG가 함유된 사료를 4주간 급여하여 조사되었다. 항-IgG혈청의 반응성이 10배로부터 80희석 배율까지 있었으며 항-담체2혈청의 반응성은 매우 높았다. 담체1 또는 담체2가 성장,사료효율, 간장 및 비장무게에 영향을 미치지 않았다. 이 결과를 기초로 담체1 과 담체2를 자돈의 항-IgY혈청 생산의 모델 실험을 실시 하였다. 자돈에서 사료중 담체 1 또는 담체 2는 항IgG(토끼항체) 또는 IgY혈청의 반응성을 8배 로무터 1,280배의 회석배율에서 있었다. 항담체혈청의 반응성은 1,280로부터 256,000배가 되었다. Immunoblot 결과 항-IgY혈청은 IgY와 확실히 반응하였다.

본연구 결과는 담체1 과 담체2는 자돈에서의 항-IgY-혈청 생성을 시킨다는 것을 나타내었다.

제2절 서론

항체는 단백질이므로 소화관내에서 소화과정 중에 소화되어 항체의 작용이 없어질 것이다. 따라서섭취시 항체 작용기의 소화억제에 의한 항체작용의 전이 가능성이 Michalek등 (1995)에 의하여 발표되었다. 한편 어린 가축(병아리, 자돈,고양이)에서는 항체가 소화되지 않은체 소화관에서 체내에 진입하여 수동면역이 이루어진다(Lung NP등, 1996; Casar ML 등, 1996). 항지방세포막단백질 혈청의 투여로 체지방축적의 감소는 in vivo에서 렛트 (Parton et al., 1990; Hu et al., 1992), 돼지 (Kestin et al., 1993), 소 (Cryer et al., 1984), 닭 (Dong et al., 1991; Butterwith et al., 1989, 1992a), 양 (Nassar and Hu., 1991)등에서 보고된바 있다. 따라서 어린 자돈에서 항-항지방

세포막단백질-IgY가 형성되면 이것은 돼지 자돈의 지방세포에 작용하여 사료효율을 증가시킬런지도 모른다고 가정할수 있다. 본보고서는 대조IgY를 이용하여 어린가축에서 항-IgY 혈청이 형성 되는지에 대하여 조사하여 정리하였다.

제3절 재료 및 방법

지방세포 분화조절, 지방 생합성 또는 지방축적 조절에 항체의 산업적 이용 가능한 방법으로 사료에 첨가하거나 주사로 주입하는 방법이 있다. 주사 주입에 의한 방법은 노동력의 증가로 관리비가 증가하므로 실제 이용에 어려움이 따른다. 사료에 첨가해서 이용이 가능하다면 성력화에도 도움이 되므로 실제 이용 또는 산업화도 쉽게 이루어질것이다.

실험방법

IgY 와 담체가 함유된 사료급여시의 항IgY혈청 및 항담체혈청의 반응성.

산업화의 청번째 기초연구로 어린가축에서 IgY(또는항혈청)의 작용기의 반응성을 전달하는 담체(Vehicle)가 함유된 사료 급여시의 IgY(또는항혈청)에 대한 항혈청의 형성에 대하여 조사하엿다. 본연구에서는 항-항-지방세포막단백질-IgY 혈청을 발생시켜서 이것의 체지방함량 조절에 이용할수 있을런지에 대한 기초연구로서 이루어졌다.

담체 스크리닝

혈액내에서 항체의 작용을 재생시키는 담체를 스크리닝하기 위하여 담체 와 항체에 대한 항체가 생산될것인가를 조사하였다. 우선 부로일러에서 담체1 과 담체2를 선정하여 조사하였다. 부로일러에서의 담체들에 대한 독성 유무를 조사하고 이결과를 바탕으로 자돈에 급여하였다. 돼지는 시간과 연구비가 많이 소요되므로 부로일러에서 먼저 가능성을 확인하였다.

동물 실험

항체 와 담체가 함유된 사료를 부로일러와 자돈에 급여하여 4주간의 항-IgY혈청 및 항담체혈청 반응성을 조사하였다.

항체반응성

1. 용해성 항원의 반응성 제3장에 기재된 방법과 같이 ELISA와 Immunoblot으로 결정하였다.

2. 항 고체(Solid)담체1 항혈청 반응성의 측정응 ELISA (Antibody Sandwitch ELISA)법으로 먼저 96 Well에 항혈청(Serial Dilution)을 부착하고 다음에 담체1 (Solid)으로 항혈청을 Blocking하고 Blocking안된 혈청에 Secondary antibody Alkaline phosphotase Conjugate을 부착시킨후에 발색도를 측정(ELISA Reader)하여 발색도의 감소로 반응성을 측정하였다.

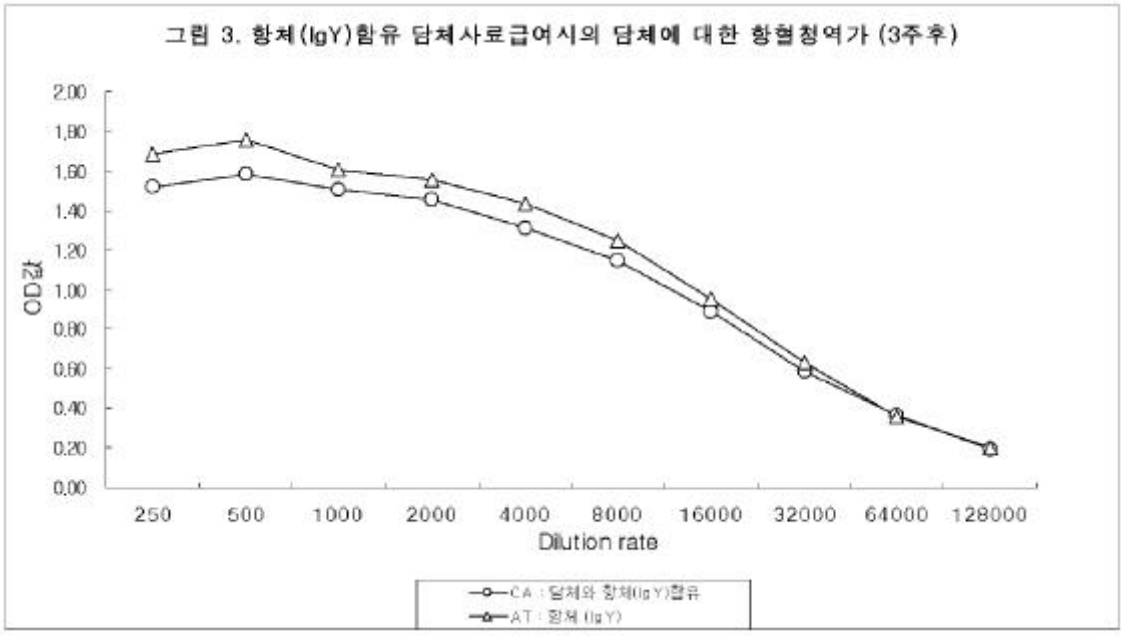
3. Immunoblot은 제3장에 기재된 방법과 동일하다.

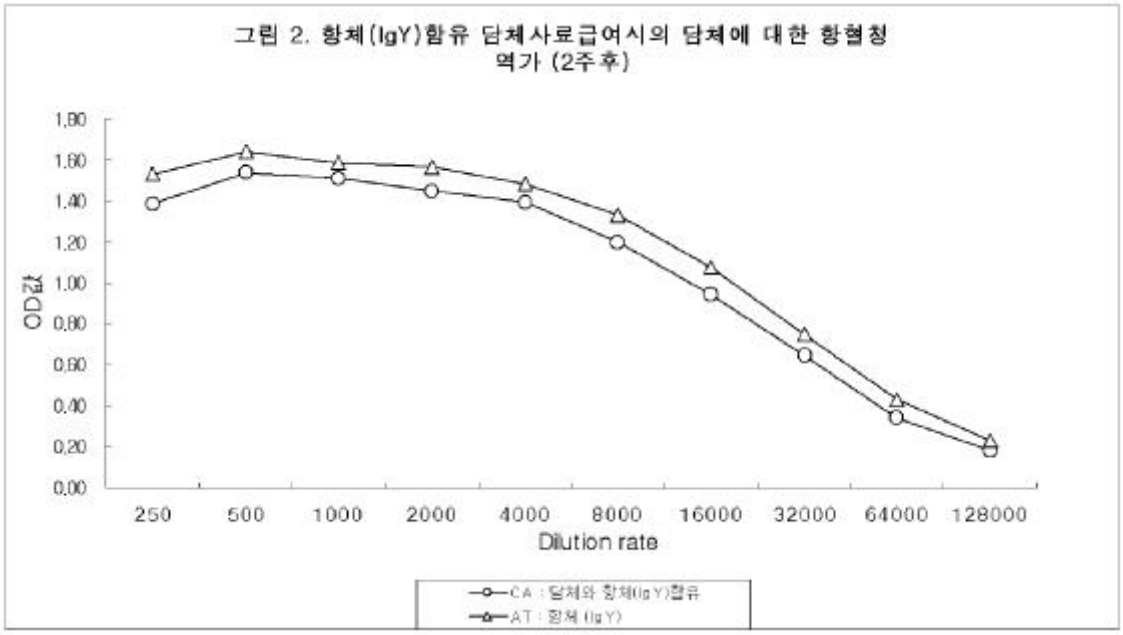
제4절. 결과 및 고찰

1. 부로일러을 이용한 모델 실험

가. 모델 실험 A. 항-IgY혈청의 반응성에 미치는 담체 1 과 담체2의 영향

1) 항담체1-혈청의 반응성





항체함유담체사료 급여시 담체에 대한 역가를 항체(IgY)만 함유된 사료 급여시와 비교하여 그림 1에는 급여 1주째 그림 2에는 급여 2주째 그림 3에는 급여 3주째에 형성된 항담체-혈청의 반응성을 측정하여 표시하였다. 급여후 1주째(그림1)에는 IgY담체사료의 급여로 IgY함유사료를 급여한것에 비해서 OD 값이 높아졌다. 급여 2주째(그림2) 및 3주째(그림3)에는 IgY 담체사료의 급여로 IgY사료를 급여한것에 비해서 OD 값이 변함없이 낮아졌다.

고체담체의 반응성 측정(ELISA)에서 설명한바와 같이 항담체-항체가 형성되면 항혈청이 담체와 결합한다. 그림2 및 그림 3에서 담체가 함유된 사료급여시에 담체에 대한 반응성(OD값)이 낮아지는 것은 항담체혈청이 생성되고 있다는 것을 나타낼런지도 모른다.

2) 담체사료 급여시 와 기초사료 급여시 항담체혈청의 반응성

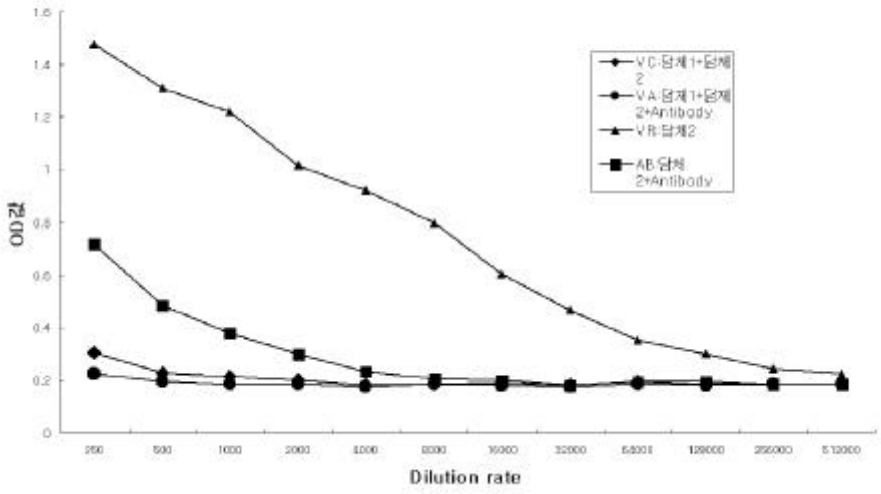
급여 1주째(그림4) 급여 2주째(그림 5) 및 급여 3주째(그림 6)의 항담체혈청의 반응성 (OD값)을 기초사료의 담체에 대한 반응성과 비교하여 표시하였다. 급여후 1주째(그림4: 성략) 2주째 (그림5) 및 3주째 (그림6: 성략)에서 담체에 대한 OD값은 일정한 경향을 나타내지 않았다. 급여3주째는 담체함유사료 와 기초사료 급여한것에서 OD값이 거의 동일한값이 되었다.

잠정적 결론 : 항체와 담체가 함유된사료 (그림 1, 2, 3) 급여시와 담체만 함유된

사료(그림 4. 5, 6) 급여시의 담체에 대한 항체역가를 비교하면 항체가 함유된경우에 항담체혈청의 반응성이 일정하여 사료에 IgY가 함유되면 항담체혈청이 일정하에 형성된다고 생각되었다.

3) 4주령 병아리에서 IgY 함유 담체 1, 담체2 급여가 항담체2혈청의 반응성에미치는 영향 (Figure 7)

Figure 7. 담체1, 담체2 및 항체의 혼합물 급여가 담체 D 에 대한 4주령 부로일러에서의 항혈청 역가



4주령 부로일러에서 항담체2혈청의 반응성(그림7)은 매우 높았다. 담체2가 함유된 사료를 4주간 급여하면 담체2에 대한 항혈청의 반응성은 256,000배의 회석시까지 나타나서 매우 높은 역가를 나타내었다. 담체2와 항체(IgY)가 함유된 사료를 급여하면 항체가는 약 4,000 회석할 때까지 담체2에 대한 반응성이 존재 하였다.

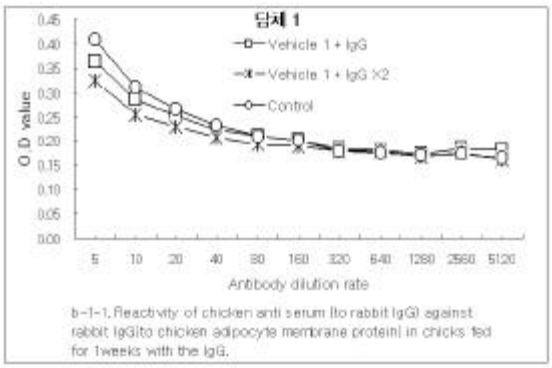
그림 1, 2, 3 및 그림 7에서 알수 있듯이 담체1 이나 담체 2와 항체(IgY)를 함께 급여하면 항체에 대한 반응이 존재한다는 것을 알수 있다.

4) 항체에 대한 항체가

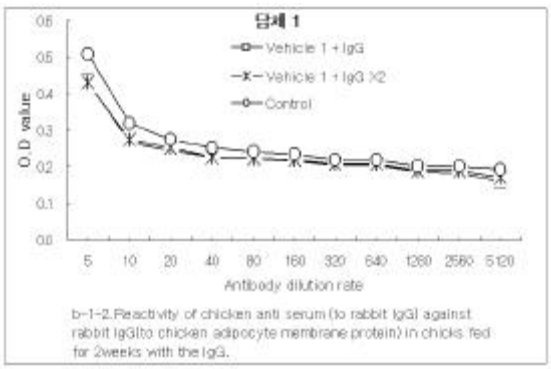
실험에 사용한 항체(IgY)가 가금항체이다. 동종간의 동일조직에 대한 항체는 형성되지 않는 것으로 생각되었다. IgY에 대한 부로일러의 항혈청에 대한 항체가는 동일동종간에 항원항체반응으로서 항체가측정이 잘되지 않아서 본보고서에서 성략 하였다.

나 모델 실험 B. **항**IgG(**정제토끼항혈청**)**혈청의 반응성과 담체**1**과 담체** 2**의 영향**

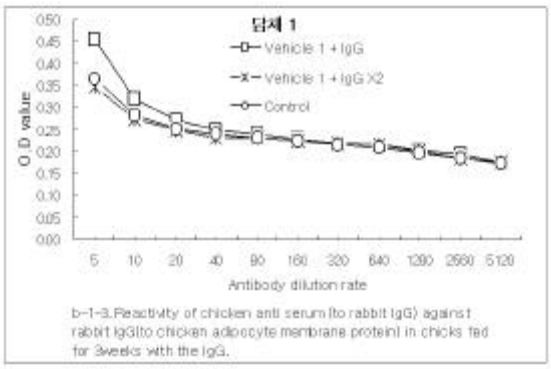
1). **담체** 1**중 항체**(IgG)**농도 와 항**IgG**혈청의 반응성**



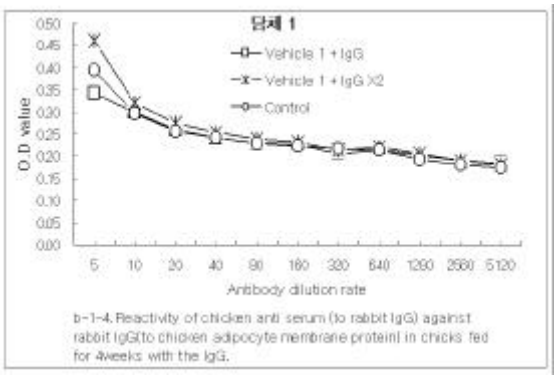
b-1-1. Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 1weeks with the IgG.



b-1-2. Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 2weeks with the IgG.



b-1-3. Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 3weeks with the IgG.

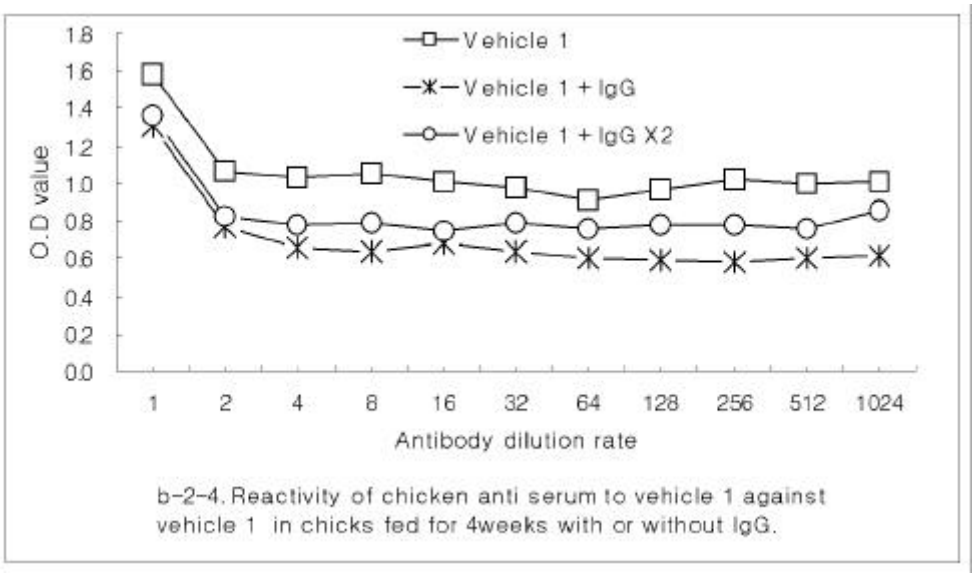


b-1-4. Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 4weeks with the IgG.

담체 1**중 항체**(IgG : rabbit anti-chicken adipocyte- membrane serum) **농도가 항**IgG**혈청 반응성에 미치는 영향을 그림** b-1-1,2,3 **및** 4**에 나타내었다.** IgG x 2**는 두배의** IgG**가 함유되었다는 것을 뜻한다. 주령이 경과하면서 대조에 비해서 항**IgG**혈청의 반응성이 높아져서** 4**주령에는** 40-80**배 휘석에서도 반응성을 보였다.**

2) **항담체**1**혈청의 반응성**

담체 1**중 항체**(IgG) **농도가 항담체** 1(Vehicle 1)**혈청의 반응성에 미치는 영향을 그림** b-2-4**에 나타내었다. 담체** 1**과 항체를 함께 급여하면 항담체**1**혈청의 반응성** (OD**값**)**이 유의하게 낮아지고 있다는 것을 그림** b-2-4**는 설명한다. 담체** 1**은 고체이므로** ELISA**의 반응성**(OD**값**)**이 낮아질수록 항담체**1**혈청의 생성량이 많아져서** OD**값의 상승억제는 모델실험** A**의 성적과 같은 경향을 설명한다.**



b-2-4. Reactivity of chicken anti serum to vehicle 1 against vehicle 1 in chicks fed for 4weeks with or without IgG.

Table 1. Effect of vehicle 1 containing IgG on the daily gain, feed efficiency, liver and spleen weight during 4 weeks of experimental feeding period

Vehicle		Gain		Feed Efficiency		Liver*		Spleen*	
Week-old		2	4	2	4	2	4	2	4
	IgG	g/d/b		Gain/Feed		---- g/100g BW----			
Control	Free	16.2	40.1	44.0	51.2	4.56	3.02	0.1060	0.0915
Vehicle 1	Free	16.2	40.9	45.1	51.0	3.47	3.20	0.0872	0.1008
Vehicle 1	IgG	18.5	44.7	50.1	57.1	3.83	3.10	0.0957	0.1408
Vehicle 1	IgGx2	18.5	41.0	50.1	52.0	3.70	2.95	0.0727	0.0846

* Values are average of 2 birds.

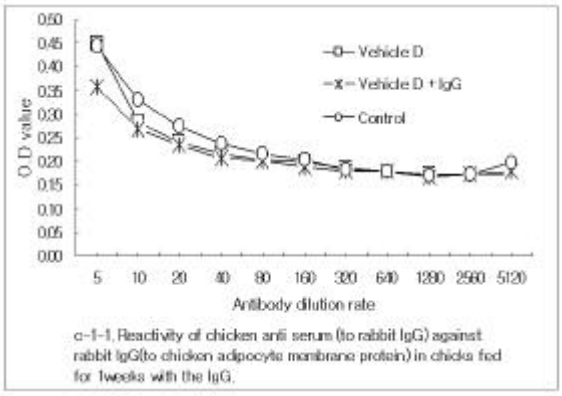
3) **담체 1중 항체(IgG)농도가 부로일러의 증체, 사료효율, 간장 및 신장무게에 미치는 영향**

Table 1**에는 실험 사육 기간 중에서 2주령 및 4주령부로일러의 증체, 사료효율,**

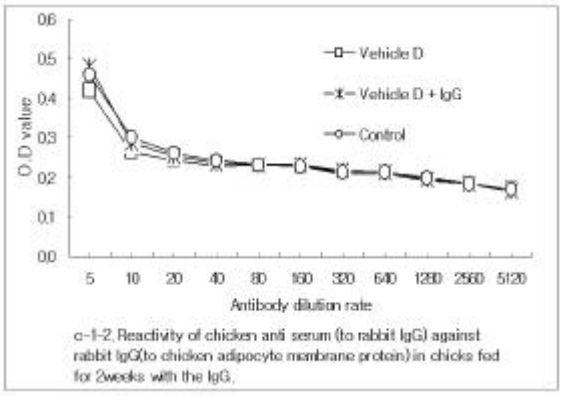
간장 및 비장의 무게를 나타내었다. 통계적인 처리가 되지는 않았으나 담체1 이나 여기에 함유된 IgG의 농도가 부로일러의 사육성적에 미치는 영향은 없었다.

다. 모델 실험 C. IgG(토끼혈청)가 함유된 담체2의 급여와 항IgG혈청의 반응성

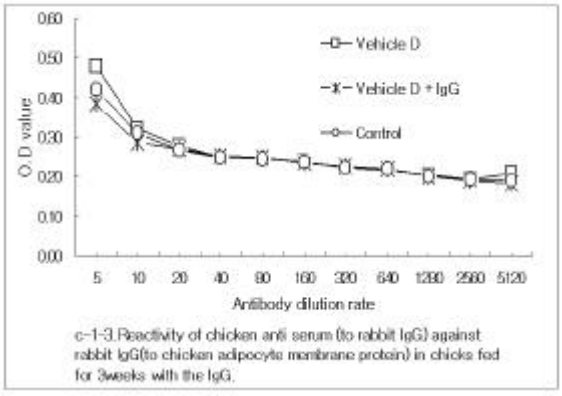
1) 항항체(IgG)혈청 생성에 미치는 담체 D의 영향



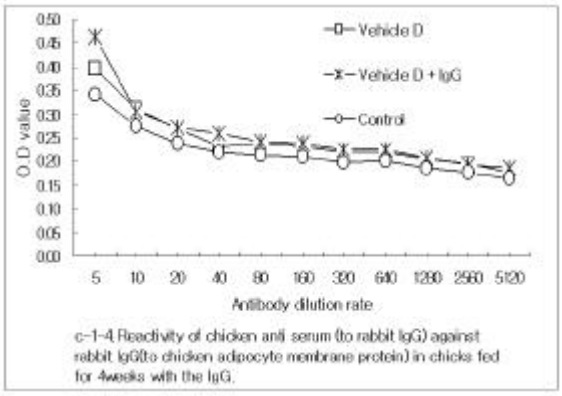
c-1-1.Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 1weeks with the IgG.



c-1-2.Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 2weeks with the IgG.



c-1-3.Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 3weeks with the IgG.



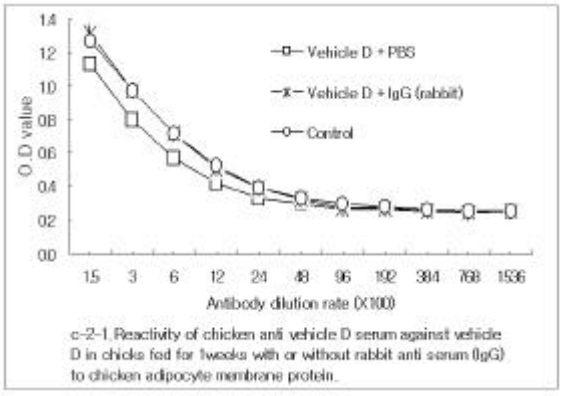
c-1-4.Reactivity of chicken anti serum (to rabbit IgG) against rabbit IgG(to chicken adipocyte membrane protein) in chicks fed for 4weeks with the IgG.

IgG가 함유된 실험사료를 4주 동안 급여하여 주령별 항IgG항혈의 반응성(그림 c-1-1, 2, 3, 및 4)은 그림에서 알수 있는 바와 같이 4주령에는 담체 D 함유 사료의 급여로 유의하게 높은 반응성의 항IgG혈청이 생성되었다. 그러나 항IgG혈청은 담체 D만 급여해도 생성 되므로 이에 대한 설명이 필요하다고 생각되었다.

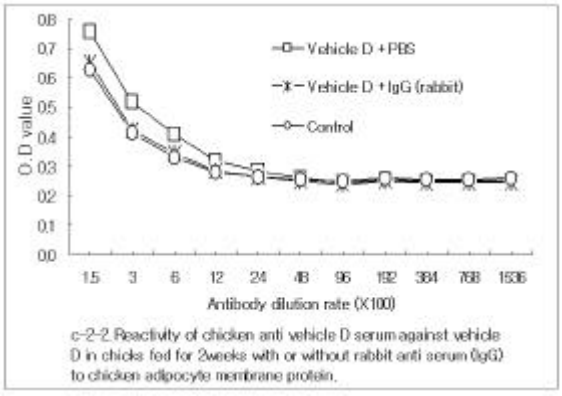
2) 부로일러에서 항담체 D혈청의 반응성

부로일러에서 IgG 와 담체 D가 함유된 사료를 4주 동안 급여하고 주령별 항담체D 혈청의 반응성(그림 c-2-1, 2, 3, 4)은 대조에 비해서 2주령부터 유의하게 높아졌으며

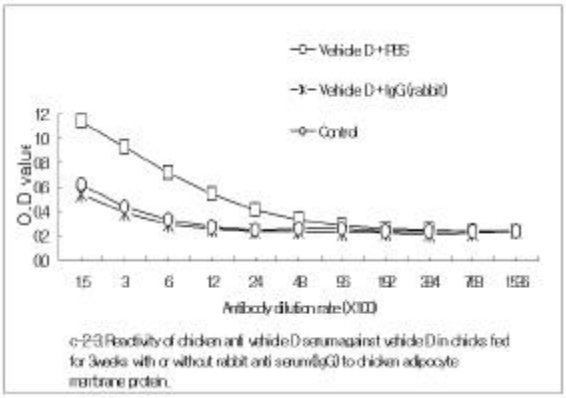
3주령 과 4주령에는 9,600배 희석에도 반응성을 보였다. 그러나 IgG가 함유되면 항담체 D혈청의 반응성이 증가하지 않았다. 그 이유는 알수 없었다.



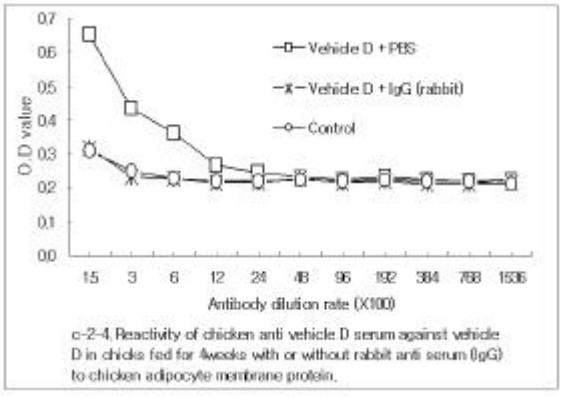
c-2-1. Reactivity of chicken anti vehicle D serum against vehicle D in chicks fed for 1weeks with or without rabbit anti serum (IgG) to chicken adipocyte membrane protein.



c-2-2. Reactivity of chicken anti vehicle D serum against vehicle D in chicks fed for 2weeks with or without rabbit anti serum (IgG) to chicken adipocyte membrane protein.



c-2-3. Reactivity of chicken anti vehicle D serum against vehicle D in chicks fed for 3weeks with or without rabbit anti serum (IgG) to chicken adipocyte membrane protein.



c-2-4. Reactivity of chicken anti vehicle D serum against vehicle D in chicks fed for 4weeks with or without rabbit anti serum (IgG) to chicken adipocyte membrane protein.

Table 2. Effect of vehicle D with IgG on the daily gain, feed efficiency, liver and spleen weight during 4 weeks of experimental feeding period

Vehicle		Gain		Feed Efficiency		Liver*		Spleen*	
	Week	2	4	2	4	2	4	2	4
	IgG	g/d/b		Gain/Feed		------g/100gBW-----			
Control	Free	16.2	40.1	44.0	51.2	4.56	3.02	0.1060	0.0915
Vehicle D	Free	17.2	52.6	46.6	65.6	3.67	3.11	0.0821	0.0993
Vehicle D	IgG	14.8	42.4	40.2	54.2	3.72	3.12	0.0928	0.0825

* Values are average of 2 birds.

3) **담체 2가 부로일러의 성장에 미치는 영향**

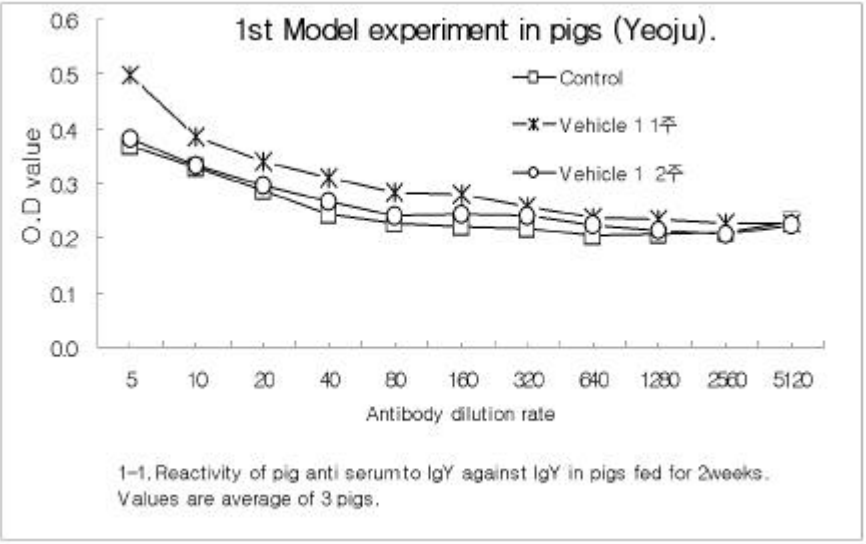
Table 2**에 보이고 있는 바와 같이 통계적인 처리는 불가능했으나 담체 D가 간장이나 비장 중량에는 미치는 영향은 발견되지 않았다. 증체나 사료 효율은** IgG**가 함유된 담체D를 급여하면 낮아지는 경향이 있었다. 이때 담체 D에 대한 항혈청도 만들어 지지 않았다.**

이상과 같이 담체 1 및 담체 2와 IgG**가 함유된 사료를 4주간 급여하면 항** IgG**혈청의 반응성이 있었다. 4주째 항** IgG**혈청의 반응성이존재한다는 것은 병아리에서 소화관에 장기간** IgG**가 머믈면 이에 대한 항혈청이 발생할 가능성이 높다는 것을 나타낼런지도 모른다. 그러나 담체들의 항혈청을 발생시키는 메커니즘은 설명되 않았다. 한편 담체 1이나 담체 2가 병아리의 발육 성적에 미치는 뚜렸한 영향이 관찰되지 않았다.**

2. IgY(**항체)가 함유된 담체 급여시 자돈에서의 항혈청 역가**

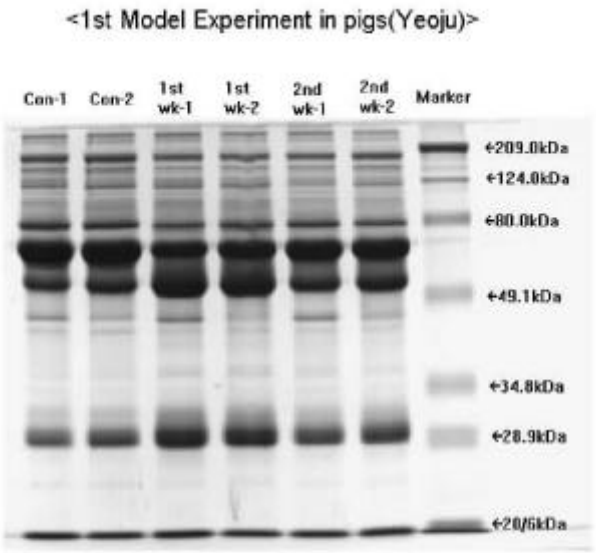
가. 모델 실험 1. IgY**와담체 1의 급여와 항**IgY**혈청의 반응성(여주)**

1) **자돈(여주)에서 항**IgY**혈청의 반응성에 미치는 담체1의 영향**



1-1. Reactivity of pig anti serum to IgY against IgY in pigs fed for 2weeks. Values are average of 3 pigs.

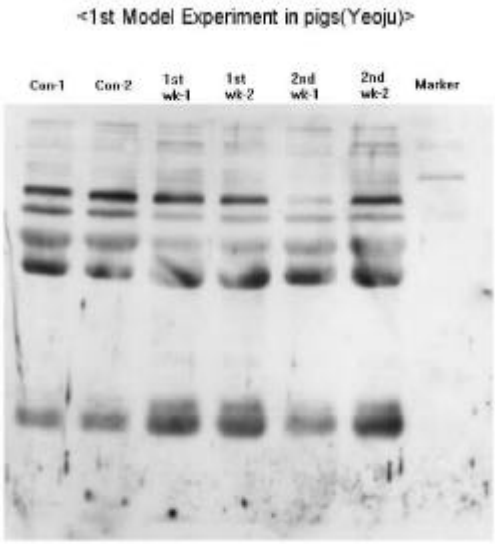
가) 자돈(여주)에서 항IgY혈청의 반응성에 미치는 담체1의 영향은 그림 1-1에 나타내었다. 분만후부터 IgY가 함유된 담체 1을 급여하면 1주령의 자돈에서 1,280배 휘석한 형청에서도 항IgY혈청의 반응성이 검출되었다. 그러나, 2주령에는 항IgY혈청의 반응성이 대조 와 유의차가 검출되지 않았다.



Electrophoresis 2. Effect of vehicle 1 on the protein profile of pig anti serum to IgY pigs fed on the diet containing vehicle 1 and IgY for 4wk.

나) 자돈(여주)의 항IgY혈청의 전기영동상

Electrophoresis 2**에는 자돈 혈청의 전기영동상을 나나타내었다**. 49.1 kDa **과** 80.0kDa**사이에 항체의 진한 밴드가 관찰되었으며**, 28.9kDa **부근에서도 확실한 밴드가 관찰되었다. 대조에서는** 1**주령의 밴드 농도에 비해서 색상이 약해지는 것이 특징이었다**.



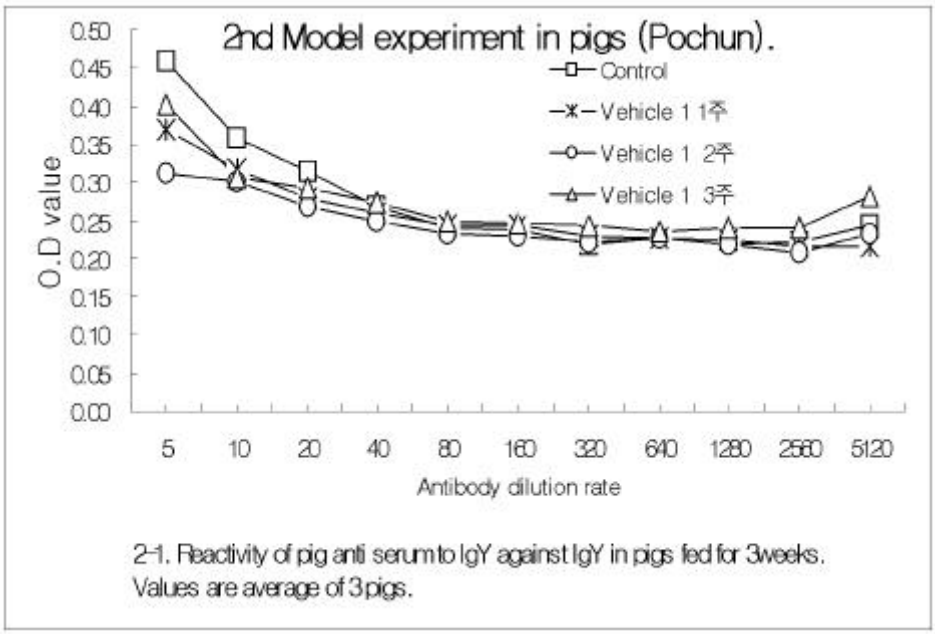
Immunoblt 4. Immunoblot of pigs anti serum to IgY pigs fed on the diet containing vehicel 1 and IgY for 4wk.

다) 자돈(여주) 항 IgY**혈청의 전기영동상에 대한** IgY(**담체**1)**의** Immunoblot

Immunoblot 4**에는 자돈(여주) 항**IgY**혈청의 전기영동상을** IgY**로** Immunoblot **한 사진이다. 전기영동상의 밴드의 경우하고는 달리 대조에 비해서** 28.9kDa **부근에서도 확실한 밴드가 관찰되었다.** 28.9 kDa **부근에서** IgY**와 결합하는 단백질이 담체**1**과**IgY**를 함께 급여했을 때 생성되고 있다는 것을 나타내었다.**

나. 모델실험 2. **포천 자돈에서** IgY**와 담체** 1**의 급여와 항**IgY**혈청의 반응성**

1) **자돈(포천)에서 항**IgY**혈청의 반응성에 미치는 담체**1**의 영향**

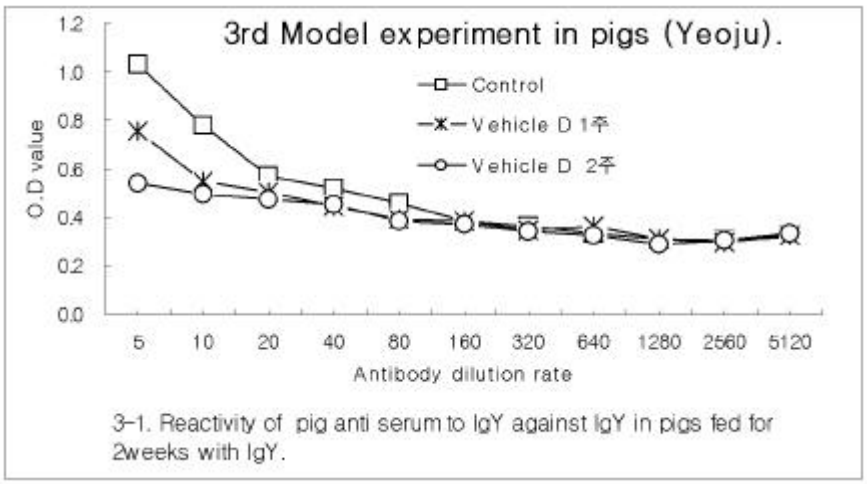


2-1. Reactivity of pig anti serum to IgY against IgY in pigs fed for 3weeks. Values are average of 3 pigs.

포천 자돈에서는 항IgY혈청이 검출되지 않았다. 그러나 희석배율을 낮추면 3주령에 항IgY혈청이 대조보다 높았다. 이것은 적정 항원 항체 반응을 조사하기 위한 순서적 희석 반응 실험이 필요하다고 생각되었다.

나. 자돈(여주) IgY 함유 담체 D의 급여와 항IgY혈청의 반응성

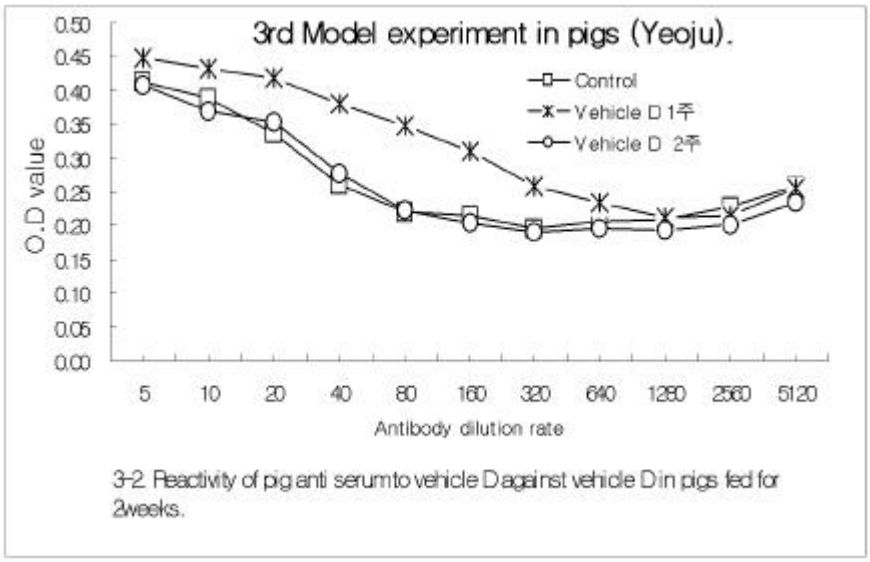
1) 자돈(여주)에서 항IgY혈청 반응성과 담체 D의 영향



3-1. Reactivity of pig anti serum to IgY against IgY in pigs fed for 2weeks with IgY.

여주에서 담체 D와 IgY를 함께급여하여 항IgY혈청의 반응성 검정을 위한 세번째 실험이 실시되었다. 상기 그림(3- 1)에서 볼수 있는바와 같이 대조에서 IgY에 대한 반응성이 더높았다. 그 이유는 알수 없었다. 그러나 1주째 항IgY혈청의 반응성은 2주째에 비해서 약 20배 휘석 까지 반응성을 나타내었다.

2) 자돈(여주)에서 항담체 D혈청의 반응성



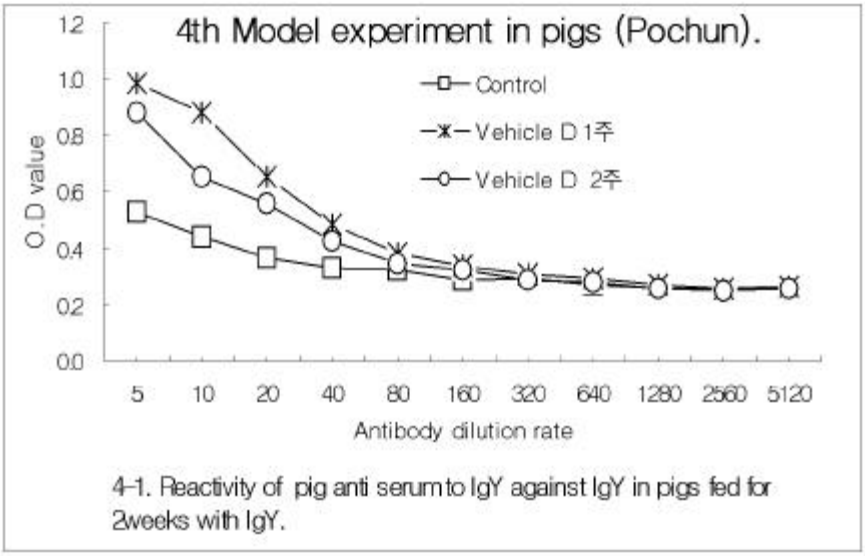
3-2 Reactivity of pig anti serum to vehicle D against vehicle D in pigs fed for 2weeks.

여주에서 담체 D를 이용한 세번째 실험에서 항담체D혈청의 반응성(3- 2그림)은 2주째 및 대조에 비해서 640- 1280배 휘석할때까지 반응성이 존재하였다.

라. 모델 실험 4. 포천 자돈에서 IgY와담체 D의 급여 와 항IgY혈청 생성

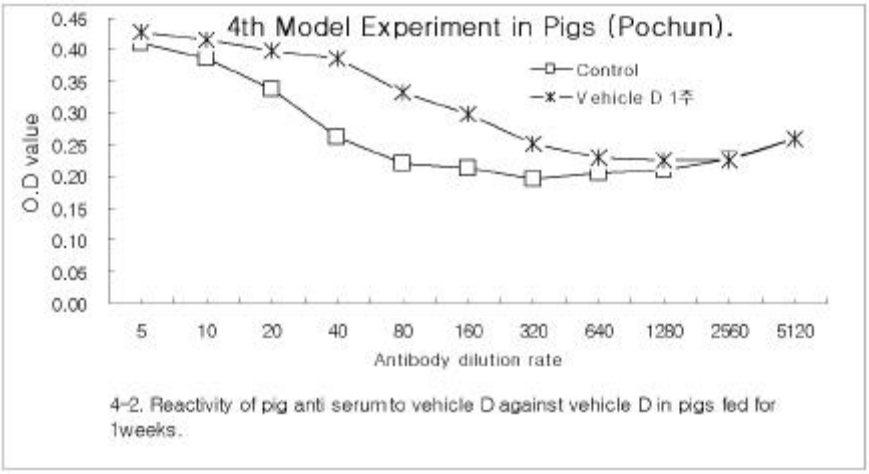
1) 자돈(포천)에서 항IgY혈청의 반응성에 미치는 담체 D의 영향

가)그림에서 알수 있는 바와 같이 포천자돈에서 실시한 네 번째 실험에서 대조에 비해서 1주 및 2주령 모두 160배로 휘석 할 때까지 항IgY혈청의 반응성이 있었다.



4-1. Reactivity of pig anti serum to IgY against IgY in pigs fed for 2weeks with IgY.

나) 자돈(포천)에서 항담체 D혈청 생성



4-2. Reactivity of pig anti serum to vehicle D against vehicle D in pigs fed for 1weeks.

그림에 보이고 있는 바와 같이 네번째 실시한 실험에서 항담체D혈청은 약 640배 휘석에 담체D와 반응성이 존재 하였다.

Table 3. Effect of dietary vehicles on the reactivity of the antiserum with the IgY and the vehicle:

No.	Species	Vehicle	Age	Anti-serum to IgY or IgG	Immunoblot	Antiserum to Vehicle
1.	Broiler	Vehicle 1	4 wk	-1)	N2)	Found
2.	Broiler	Vehicle 2	4 wk	-	N	256,0003)
3.	Broiler	Vehicle 1	4 wk	40-803)	N	1,024
4.	Broiler	Vehicle D	4 wk	10	N	4,800
5.	Pig	Vehicle 1	1-2 wk	1,280	Blot4)	N
6.	Pig	Vehicle 1	3 wk	10	Blot	N
7.	Pig	Vehicle D	1 wk	80	Blot	1,280
8.	Pig	Vehicle D	2 wk	80-160	Blot	1,280

1) Failure of Experimental Design. 2) N : Not challenged
3) Dilution rate(**회석배율**), 4)Reaativity of antiserum with the IgY wss found.

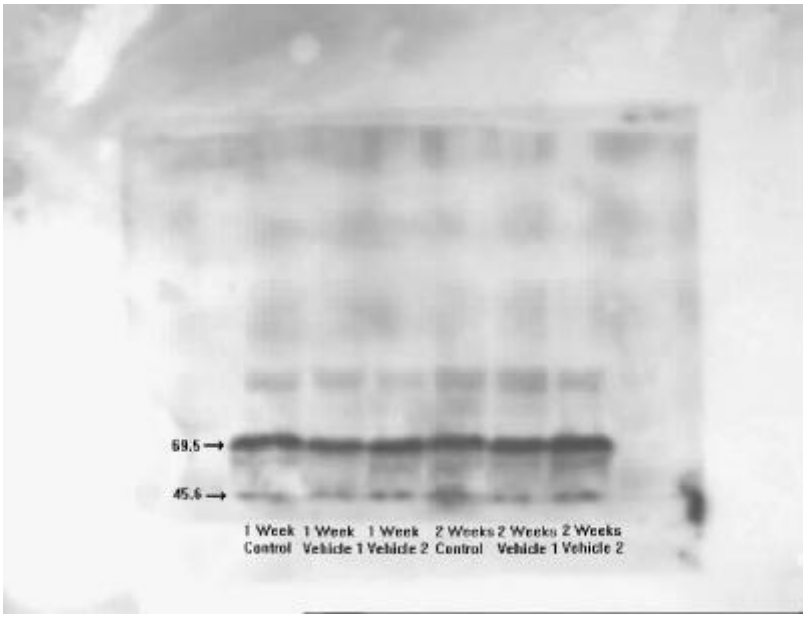


사진 1. Vehicle 1 과 Vehicle 2(**여주** 1,2주)**의** Immunoblot

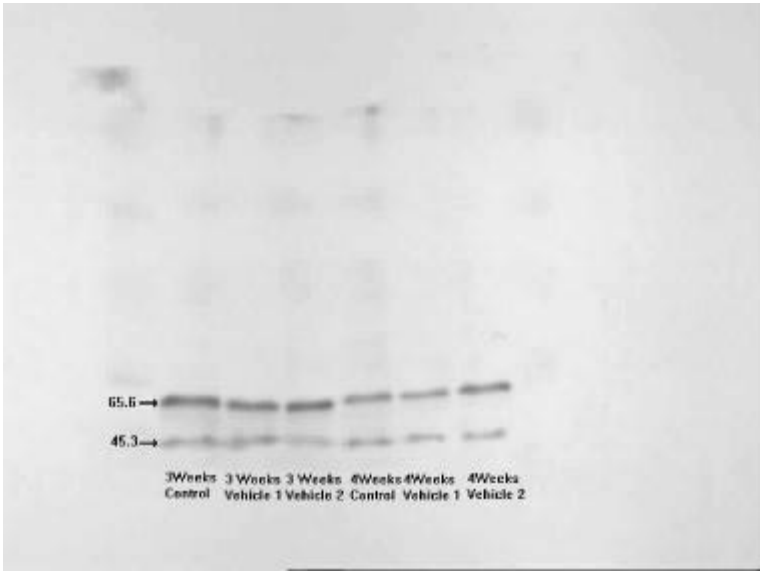


사진 2 Vehicle 1 과 Vehicle 2(여주 3, 4 주) Immunoblot

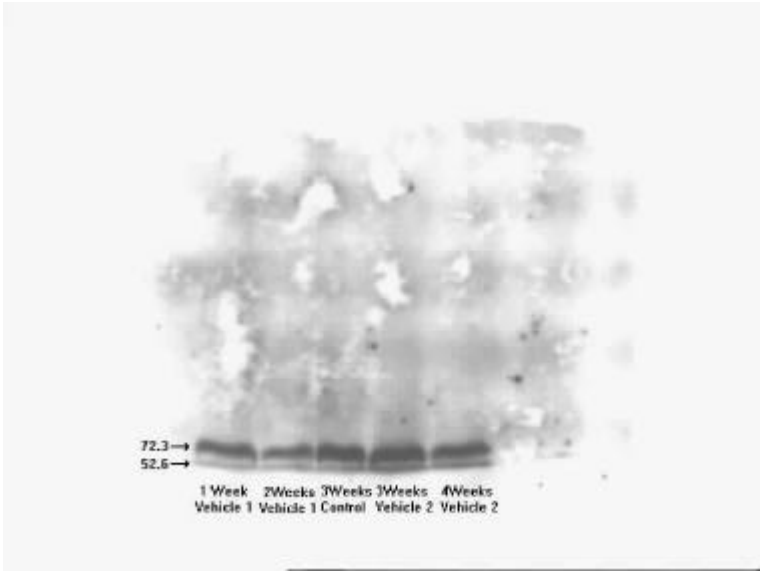


사진 3. Vehicle 1 (포천1,2,주)와 Vehhicle 2(포천3, 4주)의 Immunoblot

Table 4. Effects of dietary vehicles and age of pigs

on the reactivity of anti-IgY serum

Vihicles	Week-old	Reactivity/Dilution	
		Yeoju	Pochun
Vehicle 1	1	256	256
	2	32	64
	3	16	-
	4	8	-
Vehicle 2	1	128	
	2	16	
	3	8	256
	4	8	32

항IgY혈청의 반응성에 미치는 담체의 역할을 사진 1과 2 및 3 그리고 Table 3과 Table 4에 정리하였다. 실험에 사용된 담체 1 또는 담체 2는 항 IgY와 10배 로무터 1,280배의 회석배율에서 반응성을 보였다. 그리고 담체에 대한 반응성도 1,280으로부터 256,000배까지 높은 반응성을 보였다. 한편 Immunoblot 결과도 확실히 반응성을 보여주고 있다.

고찰 : 자돈 소화관에서 분비되는 소화효소 活性은 발육에 따라서 변化한다[1,2]. Lipase활성은 출산시부터 높으며 돈유중의 젖糖(Lactose)을 소화하기 위한 Lactase 活性은 생후 3주령까지 높고, 그 後는 점차 낮아진다. 다른 탄수화물 분해효소인 amylase, maltase, sucrase와 단백질분해효소의 活性은 낮다. 3주령까지는 Lactose나 카제인 이외 영양소의 소화가 낮으므로 본연구에서 주령이 경과와 함께 항-IgY혈청의 반응성이 낮아지는 것은 단백질 소화효소의 활성의 증가에 따르는 것일 수도 있다.

돼지는 태아 단계에서는 모체의 태반을 통한 면역이 이전되지 않으나, 신생돈은 초유를 섭취하여, 그 중에 함유되는 면역 Globulin (주로γ-Globulin)은 생후 24-48 시간에 장관으로 부터 직접 흡수되어 혈중에 이행한다. 이 이행항체는 2주령에 급격히 감소하는 한편, 자돈체내에서 서서히 항체가 생산되어 감염에 저항할수 있는 능력이 생기나, 자돈의 항체생산은 이행항체의 소실에 비해서 늦어진다. 따라서 본연구에서와 같이 면역항체(Globulin)의 공급원으로 적당한 담체에 의한 IgY의 급여는 유효할런지도 모른다. 그러나 본연구가 이행항체인지 아닌지에 대한 확인 실험은 실시되지 않았다.

그러므로 다음 연구에서는 실제 산업적 가치로서 돼지의 체지방 감소 와 사료효율 증가 또는 성장률증가등이 있는지를 검토해볼 필요가 있을것이다.

상기 사진은 여주에서 담체 D를 이용하여 IgY에 대한 항혈청생산에 사용한 자돈을 촬영한것이다.

제5절 참고문헌

1. Michalek,S.M., N.K.Childerts, and M.T. Dertzbaugh.1995. Vaccination strategies for mucosal pathogens. pp. 269-301 in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 2nd Ed., J.A. Roth,ed. Washington,DC:American Society forMicrobiology.

2. Lung NP, Thompson JP, Kollias GV Jr, Olsen JH, Zdziarski JM, Klein PA, 1996. Maternal immunoglobulin G antibody transfer and development of immunoglobulin G antibody responses in blue and gold macaw(Ara ararauna) chicks. Am J Vet Res 57: 1162-1167.

3. Casal ML, Jezyk PF, Giger U, 1996. Transfer of colostral antibodies from queens to their kittens. Am J Vet Res 57:1653-1658.

4. Ishida Y. Taniguchi H, Baba S. Possible involvement of 1α,25-dihydroxyvitamin

D3 in proliferation and differentiation of 3T3L-1 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, 151:1122-1127.

5. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocytes to adipocytes of 3T3-L1 cells. Comp. Biochem. Physiol., 1990, 96A:323-326.

6.**北川泰雄, 小野雅昭, 脂肪分化와 細胞外** Matrix. **細胞** 1991, 23:175-178.

7. Kuri-Harcuch W, Wise LS, Green H. Interuption of the adipose conversion of 3T3 cells by biotin deficiency: differentiation without triglyceride accumulation. Cell. 1978, 14:53-59.

8. Flier JS, The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway? Cell. 1995, 80:15-18.

9. Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerimi A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: an in vitro model of cachexia. Science. 1985, 229:867-869.

10. Torti FM, Torti SV, Larick JW, Ringold GM. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta. J. Cell. Biol. 1989, 108:1105-1113.

11. Zhang B, Berger J, Hu Erding, Szalkwski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ gene expression contributes to the anti-adipogenic effects of tumor necrosis factor-α. Mol. Endocrinol. 1996, 10:1457-1466.

12. Nechad M, Nederegaard J, Cannon B. Noradrenergic stimulation of mitochondriogenesis in brown adipocytes differentiating in culture. Am. J. Physiol. 1987, 253:C889-C894.

13. Jones DD, Ramsay TG, Housman GJ, Martin RJ. Norepinephrine inhibits rat pre-adoipocyte proliferation. Int. J. Obest. 1992, 16:349-354.

14. Kestin S, Kennedy R, Tonner E, Kierman M, Cryer A, Griffin H, Butterwith S, Rhind S, and Flint D. Decreased fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. J. Anim. Sci. 1993. 71:1486-1494.

15.Wright JT, and Housman GJ. Monoclonal antibody-mediated cytotoxicity of adipocytes. Obes. Res. 1995, 3:265-

16.Totonoz,P, H.Erding and BM Spiegelman.1994. Stimulation of adiponesis in fibroblssts by PPARgama2, a lipid-activated transcription factor. Cell 79: 1147-1156

17.Hanson P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ, 1998. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol Methods 215:1-7.

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**