

최 중
연구보고서

돼지에 있어서 CLA(conjugated linoleic acid)의 생리적 역가판정방법 개발

Development of a method to measure
the potency of conjugated
linoleic acid(CLA) in pig

연구기관 : 충북대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지에 있어서 CLA(conjugated linoleic acid)의 생리적 역가판정방법 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 13 일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 정 정 수

연 구 원 : 이 재 준

연 구 보 조 원 : 한 설 아

연 구 보 조 원 : 문 현 석

연 구 보 조 원 : 김 진 태

요 약 문

I. 제 목

돼지에 있어서 CLA(conjugated linoleic acid)의 생리적 역가판정 방법 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근에 동물성지방의 과다섭취에 의한 성인병발생의 우려 때문에 저지방육류생산이 중요시되고 있다. 이와 관련해서 conjugated linoleic acid(CLA)가 항암, 면역증강작용뿐만 아니라 항비만 작용을 가진 것이 알려지면서 CLA의 섭취로 인체나 가축의 지방축적을 감소시킬 수 있는 가능성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 지금까지의 CLA에 대한 대부분의 연구가 여러 CLA 이성체의 혼합물을 사용했기에 어느 이성체가 그것의 고유한 작용을 가지고 있는지를 판명하기 어려웠다. 한편 국내외 여러 회사에서 CLA를 제조하고 있는데 이들이 제조한 CLA의 역가를 신속, 정확하게 판정할 필요성이 대두되었다. 본 연구의 목적은

- 1) 지방세포 배양에서 어느 CLA 이성체가 분화를 억제하는지를 구명하고
- 2) 세포배양 연구에서 지방세포의 분화를 억제한 CLA를 돼지에게 급여해서 돼지에서 지방축적을 억제하는지를 구명하고
- 3) 세포배양 및 사양실험 결과를 종합해서 돼지에서 CLA 역가판정 방법을 확립하는 것이다.

III. 연구개발내용 및 범위

본 연구는 CLA가 지방세포의 분화에 미치는 영향 그리고 분화 억제작용을 나타낸 CLA를 돼지에게 사료로 급여해서 지방축적 억제를 나타내는지를 구명해서 쉽고 정확한 CLA의 역가판정 방법을 확립하는 것이 주목적이었다. 이를 위해서 먼저 cell line인 3T3-L1 cell을 배양해서 CLA 이성체의 종류, 투여시기, 농도에 따른 CLA가 세포분화에 미치는 영향을 구명했다. 근육세포인 L₈의 분화에 미치는 CLA의 작용도 구명했다. 지방세

포 배양에서 세포분화억제 작용을 나타낸 이성체를 이용해서 3T3-L1 cell 과 갓난 돼지에서 채취한 primary fat cell에서 이들 세포의 triglyceride(Tg) 함량과 lipoprotein lipase(LPL) activity에 미치는 영향을 구명해서 한번 더 이들 CLA가 돼지에서 지방축적을 억제할 가능성을 확인했다. 마지막으로, 세포배양 연구에서 세포분화를 억제한 CLA를 비육 후기의 돼지에게 4주간 급여해서 지방축적 억제를 나타내는지 조사했는데 조사항목은 일당증체량을 포함한 성장성장성, 등지방두께, 등지방의 지방산 조성, 지방조직의 지방합성과 지방합성 효소의 activity 및 지방분해, 혈중 cholesterol함량 등이었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 결 과 요 약

가. CLA가 지방전구세포의 분화에 미치는 영향

Cell line인 지방전구세포 3T3-L1을 이용해서 여러 CLA 이성체중 어느 것이, 어느 시기에 처리하는 것이 세포의 분화억제를 가져오는지 를 구명했다. 6-well plate에 분화유도 6일전(day -6)에 cell을 seeding 해서 분화유도(day 0) 후 8일(day 8)에 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 측정에 의해 분화정도를 구명했다. 연구에 사용 된 CLA 이성체는 9cis-11cis(9c-11c), 9cis-11trans(9c-11t), 9trans-11trans (9t-11t), 10trans-12cis(10t-12c) 및 CLA mixture (CLAmix, 10t-12c 44% 함유)이었으며 CLA 처리한 시기는 분화유도전(day -6~0), 분화 유도후(day 0~8), 배양전기간(day -6~8)이었다. 여러 이성체중 10t-12c 와 CLAmix의 세포분화 억제작용이 두드러졌고 분화유도전(day -6~0) 보다 분화유도후(day 0~8) CLA 처리가 분화를 더 크게 억제했다. 50uM의 CLA가 20uM보다 더 크게 분화를 억제했다. 9c-11c는 세포분화 를 촉진했고, 다른 이성체의 작용은 두드러지지 않았다.

나. CLA가 L8 근육세포의 분화에 미치는 영향

본 연구의 주목적이 지방축적억제를 가져오는 CLA 이성체를 찾는 것인데, 여기에서는 CLA가 근육세포의 분화에 미치는 영향을 조사했다. 근육세포를 사용한 이유는 CLA가 근육세포에서는 지방세포와 다르게 작용하는지를 구명하고, 또 어느 이성체가 지방세포의 분화를 억제하고 근육세포의 분화는 촉진할 경우, 가축의 생산성 향상을 위해서는 이상적인 CLA 이성체가 될 수 있기 때문이었다. 본 연구에 사용한 근육세포는 L8 cell이었는데 분화유도 2일전(day -2)에 6-well plate에 seeding 했고 day 6에 creatine kinase(CK)를 측정함으로써 분화정도를 구명했다. 지방전구세포의 경우처럼 10t-12c와 CLAmix가 근육세포의 분화를 크게 억제했고, 분화유도 후(day 0~6) CLA 처리가 분화유도전(day -2~0)보다 더 크게 억제했다. 특이하게도 지방세포의 분화를 촉진했던 9c-11c가 근육세포의 분화를 크게 억제했다. 위의 결과는 CLA는 지방세포와 근육세포에서 서로 다른 작용기전에 의해 분화에 영향을 미침을 의미한다.

다. CLA가 TG와 LPL activity에 미치는 영향

앞에서 설명한대로 지방전구세포(3T3-L1)를 이용해서 10t-12c와 CLAmix가 세포분화 억제를 가져온 사실을 확인했다. 본 연구에서는 3T3-L1 cell과 갓난 돼지에서 분리한 지방전구세포(stroma-vascular cell)를 이용해서 CLA가 이들 세포의 triglyceride(TG) 함량 및 lipoprotein lipase(LPL) activity에 미치는 영향을 구명했다. 3T3-L1과 돼지 primary fat cell 모두에서 10t-12c와 CLAmix 둘 다 Tg 함량과 LPL activity를 감소시켰다. 이 결과는 10t-12c와 CLAmix를 돼지에게 사료의 형태로 급여할 때 지방축적감소를 가져올 가능성이 큰 것을 암시해 주는 것이다.

라. CLA 급여가 돼지의 지방축적에 미치는 영향

지방전구세포 배양실험에서 분화억제를 나타낸 10t-12c와 CLAmix를 돼지에게 급여해서 지방축적억제 작용을 나타내는지 조사했다. 체중 81kg인 거세한 수돼지 15마리를 본 시험에 사용했는데 5마리는 대조구(단

백질 14%, corn-soy diet), 5마리는 10t-12c구(대조구사료의 0.5% 대체), 5마리는 CLAmix(대조구사료의 0.5% 대체)에 배치했다. 총 4주 동안 1일 3.15kg의 사료를 급여했고, 체중과 사료섭취량은 2주마다, 등지방두께는 종료시(4주시)에 초음파측정기로 측정했고, 종료시에 등지방을 biopsy해서 지방산조성, 지방합성(lipogenesis), 지방합성관련 효소의 activity 및 지방분해(lipolysis)를 측정했고 0주, 2주, 4주시에 채혈해서 HDL-cholesterol과 total-cholesterol 함량을 측정했다.

증체량과 사료효율 모두 CLA 급여구가 대조구에 비해 높은 경향을 나타냈으나 유의차는 없었다. 등지방두께는 CLAmix구가 대조구보다 두꺼웠다. 지방산조성에 있어서는 10t-12c구와 CLAmix구의 10t-12c와 9c-11t 함량이 대조구에 비해 높았다. 지방조직의 지방합성량은 CLA구와 대조구간에 차이가 없었고, CLA 급여구의 malic enzyme(ME)과 fatty acid synthase(FAS)의 activity가 대조구에 비해 높았다. CLA 급여구의 지방분해가 대조구에 비해 높은 경향을 나타냈으나 유의차는 없었다. 혈중 HDL-cholesterol과 total-cholesterol의 비율은 CLA 급여구가 대조구에 비해 높았다.

본 연구의 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다.

1) 지방세포의 분화를 억제한 CLA 즉 10t-12c와 CLAmix를 돼지에게 급여했을 때 지방축적 억제를 나타내지 않았다. 즉 CLA 급여구가 대조구에 비해 등지방두께, 지방합성 및 지방합성 효소의 activity가 높거나 비슷했다. 이 사실은 CLA 급여에 의해 돼지의 지방축적을 억제하기는 상당히 어렵다는 것을 의미한다. In vitro 세포배양 실험 결과가 in vivo 돼지 사양 실험 결과에 반영되지 않아서 in vitro 세포배양 실험에 의해 신속, 정확한 CLA의 역가판정 방법을 확립하기는 어려웠다.

2) CLA 이성체중 10t-12c가 지방세포와 근육세포 모두의 분화를 억제한 반면 9c-11c는 지방세포의 분화는 촉진했고, 근육세포의 분화는 억제한 사실은 매우 흥미있는 발견이다. 9c-11c의 지방세포 분화 촉진은 학계 최초의 발견이며, 앞으로 이 9c-11c의 작용에 대해 더 세밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 활용에 대한 건의

In vitro 지방세포 배양실험에서 분화를 억제했던 CLA 이성체가 돼지 사양실험에서는 지방축적을 억제하지 않았다는 것이 본 연구의 핵심사항이다. 사양실험 결과와 세포배양실험 결과간에 상관관계가 높지 않아서 in vitro 간단한 실험에 의해 사양실험에 의한 결과를 예측할 수 없는 것이 아쉽지만, “CLA 급여에 의해 돼지의 지방축적을 억제하기는 쉽지 않다.” 는 정보도 매우 중요하다. 그래서 사료생산업자, 동물약품업자, CLA 제조 회사, 양축가 및 정부의 정책입안자 모두에게 정보를 제공해 주면 좋을 것이다.

한편, 본 연구수행중에 얻어진 실험테크닉, 즉 3T3-L1 cell, L8 cell 및 돼지 primary fat cell의 배양방법확립은 큰 수확이었고 국내의 다른 연구기관에도 전수하면 좋을 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of a method to measure the potency of conjugated linoleic acid(CLA) in pig.

II. Objectives and Significance

The demand for producing lean meats is increasing due to a possible chronic disease arising from animal fat consumption. It has been reported that conjugated linoleic acid(CLA) has many beneficial effects including anti-carcinogenic, immune-stimulating and anti-obesity effects. Thus, many studies trying determination of anti-adipogenic effect of a dietary CLA in livestock and human have been conducted. However, most of CLA studies conducted so far used mixture of various CLA isomers, instead of individual isomer. As a result, it was not possible to identify which isomer has a specific anti-adipogenic effect. Recently several pharmaceutical companies have launched manufacturing CLAs chemically. The objectives of the current study are as follows

- 1) to identify CLA isomers which has an inhibitory effect in differentiation of cultured adipocytes.
- 2) to determine if the CLA isomers, which showed an inhibitory effects on the cell differentiation, have anti-adipogenic effects in pig when supplied via diet.
- 3) to establish a method to measure a potency of CLAs by correlating the results from cell culture with those from pig growth trial.

III. Research Scope

The objectives of the current study were to determine effects of

CLAs on differentiation of fat cells and to investigate if the CLAs that showed an inhibitory effect on fat cell differentiation have anti-adipogenic effects in pigs, and to establish a method to measure the potency of CLAs by correlating the results from the cell culture study with those from a growth trial with CLAs. Employing 3T3-L1 cells, effects of kinds of CLA isomers, treatment time and CLA concentrations on cell differentiation were investigated. The effects of CLAs on muscle cell(L8) were also studied. CLA isomers, which showed an inhibitory effects on fat cell differentiation, were used to study the effects of CLAs on triglyceride(Tg) content and lipoprotein lipase(LPL) activity. Lastly, CLAs that showed an inhibitory effects on fat cell differentiation were fed to finishing barrows for 4 weeks to investigate if CLAs have anti-adipogenic effects. Items measured were growth performance, backfat thickness, fatty acid composition of backfat, lipogenesis and activities of lipogenic enzymes, lipolysis and blood cholesterol.

IV. Results and Recommendations

1. Results

1) Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on differentiation of preadipocyte(3T3-L1 cell)

The current study was conducted to determine which CLA isomer has inhibitory effect on differentiation of 3T3-L1 cell. Cells were plated 6 days before induction of differentiation on the 6-well plate and degree of differentiation was determined by measuring glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 8 days after induction (day 8). The CLA isomers employed for the current study were

9cis-11cis(9c-11c), 9cis-11trans(9c-11t), 9trans-11trans(9t-11t), 10trans-12cis(10t-12c) and CLA mixture (CLAmix, containing 44% 10t-12c). CLAs were treated pre-induction(day-6-0), post-induction(day0-6) and the whole period(day-6-8). The action of 10t-12c and CLAmix for inhibition of cell differentiation was higher than the other isomers and inhibitory effect was higher on day 0~8 than day -6~0. The effect of 50µM of CLA was higher than that of 20µM CLA in inhibition of cell differentiation. On the other hand, 9c-11c increased differentiation of 3T3-L1 cells. Effects of other CLA isomers were minimal.

2) Effect of CLA on differentiation of muscle cells(L8 cell)

The current study was conducted to determine how CLA affects differentiation of L8 cells differently, compared to 3T3-L1 cells. It would be ideal if this study can identify a CLA isomer which may increase differentiation of muscle cells while decreasing differentiation of fat cells(3T3-L1). The muscle cells(L8) were plated 2 days before induction of differentiation on the 6-well plate(day -2) and the differentiation were determined by measuring activity of creatine kinase(CK) 6 days after induction (day 6). Like the action on 3T3-L1 cells, 10t-12c and CLAmix inhibited differentiation of cells more than the other isomers. The inhibitory effect was bigger on post-induction period(day 0~6) than on pre-induction period(day-2~0). Interestingly, 9c-11c which stimulated differentiation of 3T3-L1 cell, decreased differentiation of L8 cells. These results indicate the mechanisms by which CLA affects differentiation of 3T3-L1 and L8 cells are different.

3) Effect of CLA on triglyceride content and LPL activity

The previous study confirmed that 10t-12c and CLAmix decreased differentiation of preadipocyte(3T3-L1 cell). The current study was conducted to determine the effect of CLA on triglyceride(TG) content and lipoprotein lipase(LPL) activity of 3T3-L1 and primary fat cell isolated from the new-born pigs. 10t-12c and CLAmix decreased TG content and LPL activity of both 3T3-L1 cells and pig preadipocytes. These results indicate that dietary 10t-12c and CLAmix may decrease adipogenesis of finishing pig.

4) Effect of CLA on adipogenesis of finishing pigs

The current study was conducted to determine if 10t-12c and CLAmix which showed inhibitory action on differentiation of preadipocyte decrease adipogenesis of finishing pigs. Fifteen barrows weighing ave. 80.9kg were employed, five being allocated to the control (corn-soy diet containing 14% CP), five allocated to 10t-12c(0.5% 10t-12c containing diet), and five allocated to CLAmix(0.5% CLAmix containing diet). Pigs were daily fed 3.15kg for 4 weeks. Body weight and feed intake were measured biweekly, and ultrasonic backfat thickness was measured at the end of experiment. Backfat was biopsied for the measurement of fatty acid composition, lipogenesis and lipogenic enzymes and lipolysis at the end of experiment. Blood was collected at 0, 2 and 4 week for the cholesterol measurement.

Average daily gain and feed efficiency were tended to higher in CLA groups than in the control group and backfat thickness was higher in CLAmix group. The contents of fatty acids, 10t-12c and 9c-11t of adipose tissue were higher in 10t-12c and CLAmix groups, compared to the control. There was no difference in lipogenesis among treatments.

and activities of malic enzyme and fatty acid synthase were higher in the CLA treatments groups. Lipolysis of adipose tissue was tended to higher CLA treatment group. The ratio of HDL-cholesterol and total-cholesterol was higher in CLA treatment groups.

The results of this study were summarized as follows :

a) 10t-12c and CLAmix which were found to show the inhibitory effect on the differentiation of preadipocyte did not have anti-adipogenic activity in finishing pig when CLA was provided via diet. Backfat thickness, lipogenesis and activity of lipogenic enzymes of CLA groups were higher or similar, compared to the control group. These results indicated that it is difficult to reduce adipogenesis of pigs by suppling CLA via diet. It was not possible to establish the method by which the potency of CLA isomers is easily determined via the cell culture system because there was no high correlation between the results of cell culture and those of feeding trial in regard to CLA actions.

b) The 10t-12c isomer inhibited differentiation of both fat cell and muscle cell. Interestingly, 9c-11c stimulated differentiation of fat cell while inhibiting differentiation of muscle cell. More research will be necessary to investigate the action of 9c-11c isomer.

2. Recommendation

The major finding in the current study was that CLA isomers which showed the inhibitory effect on adipocyte differentiation did not have anti-adipogenic effect in pigs when supplied via diet. Even though it was not successful to see a high correlation between in vitro cell culture data and data from growth trial, the finding that "It is difficult to reduce adipogenesis of pigs by supplying CLA via diet." is significant. It will be desirable to supply the results from the current study to all the parties interested in CLA actions, such as feed

company, CLA producers, and pig farmers. On the other hand, laboratory techniques obtained during the current study, including culture of 3T3-L1 cell, L8 cell and pig primary fat cell will be a good tool for all the researchers in this area.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chapter I. Introduction | 1 |
| Chapter II. Effect of CLA on differentiation of 3T3-L1 cell | 4 |
| Section 1. Materials and Methods | 4 |
| 1. Dilution of CLA and control | 4 |
| 2. Cell culture | 4 |
| 3. Measurement of cell differentiation | 5 |
| 4. Measurement of cell number and DNA content | 6 |
| 5. Statistics | 6 |
| Section 2. Results and Discussion | 8 |
| 1. Establishment of cell culture system for 3T3-L1 | 8 |
| 2. Effect of treatment time of CLA on differentiation of cells | 8 |
| 3. Effect of kinds of CLA on differentiation of cells | 11 |
| 4. Effect of concentrations of CLA on differentiation of cells | 16 |
| Chapter III. Effect of CLA on differentiation of muscle cell | 21 |
| Section 1. Materials and Methods | 21 |
| 1. Cell line | 21 |
| 2. Dilution of CLA and control | 21 |
| 3. Cell culture | 22 |
| 4. Measurement of cell differentiation | 24 |
| 5. Measurement of cell number and DNA content | 24 |
| Section 2. Results and Discussion | 25 |

| | |
|--|----|
| 1. Effect of kinds of CLA on differentiation of L8 cell | 25 |
| 2. Effect of concentrations of CLA on differentiation of L8 cell | 28 |
| 3. Effect of treatment time of CLA on differentiation of L8 cell | 30 |
| 4. Effect of CLA on DNA content and cell numbers | 31 |
| Chapter IV. Effect of CLA on Tg content and LPL activity of cultured cells | 34 |
| Section 1. Materials and Methods | 34 |
| 1. Isolation and culture of pig primary fat cell | 34 |
| 1) Isolation of primary fat cell | 34 |
| 2) Culture of primary fat cell | 35 |
| 2. Measurement of triglyceride | 37 |
| 3. Measurement of LPL activity | 37 |
| Section 2. Results and Discussion | 38 |
| 1. Effect of CLA on Tg content of cultured cells | 38 |
| 2. Effect of CLA on LPL activity of cultured cells | 42 |
| Chapter V. Effect of dietary CLA on adipogenesis of finishing pig | 44 |
| Section 1. Materials and Methods | 44 |
| 1. Source of CLA used for feeding trial | 44 |
| 2. Treatment and experimental animal | 44 |
| 3. Feeding of experimental diet | 45 |
| 4. Items investigated | 46 |
| 5. Analysis of fatty acid of pig adipose tissue | 47 |
| 6. Measurement of lipogenesis of pig adipose tissue | 47 |
| 1) Preparation of incubation buffer | 47 |

| | |
|--|----|
| 2) Biopsy of backfat and measurement of lipogenesis | 47 |
| 3) Lipid extraction and calculation of lipogenesis | 48 |
| 7. Measurement of lipogenic enzyme activity of adipose tissue | 48 |
| 8. Measurement of lipolysis | 48 |
| 9. Measurement of blood cholesterol | 49 |
| Section 2. Results and discussion | 49 |
| 1. Growth performance of pigs | 49 |
| 2. Fatty acid composition of adipose tissue | 49 |
| 3. Lipogenesis and activities of lipogenic enzymes of adipose tissue | 50 |
| 4. Lipolysis of adipose tissue | 53 |
| 5. Concentration of blood cholesterol | 54 |
| Chapter VI. Conclusion | 57 |
| Chapter VII. Reference | 58 |

목 차

| | |
|--|----|
| 제 1장 서론 | 1 |
| 제 2장 CLA가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향 | 4 |
| 제 1절 재료 및 방법 | 4 |
| 1. CLA 준비 및 대조구 | 4 |
| 2. 세포배양 | 4 |
| 3. 세포분화 측정 | 5 |
| 4. 세포수와 세포의 DNA 함량측정 | 6 |
| 5. 통계처리 | 6 |
| 제 2절 결과 및 고찰 | 8 |
| 1. 3T3-L1 cell의 배양방법 확립 | 8 |
| 2. CLA 처리시기가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향 | 8 |
| 3. CLA 이성체 종류가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향 | 11 |
| 4. CLA 농도가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향 | 16 |
| 5. CLA가 3T3-L1 cell의 세포수와 DNA 함량에 미치는 영향 | 18 |
| 제 3장 CLA가 근육세포의 분화에 미치는 영향 | 21 |
| 제 1절 재료 및 방법 | 21 |
| 1. cell line | 21 |
| 2. CLA 준비 및 대조구 | 21 |
| 3. 세포배양 | 22 |
| 4. 세포분화 측정 | 24 |
| 5. 세포수와 세포의 DNA 함량 측정 | 24 |
| 제 2절 결과 및 고찰 | 25 |
| 1. CLA 이성체 종류가 L8 cell의 분화에 미치는 영향 | 25 |

| | |
|--|----|
| 2. CLA 농도가 L8 cell의 분화에 미치는 영향 | 28 |
| 3. CLA 처리시기가 L8 cell의 분화에 미치는 영향 | 30 |
| 4. CLA가 L8 cell의 DNA 함량 및 세포수에 미치는 영향 | 31 |
| | |
| 제 4장 CLA가 배양세포의 중성지방과 LPL activity에 미치는 영향 | 34 |
| 제 1절 재료 및 방법 | 34 |
| 1. 돼지 primary fat cell의 분리 및 배양 | 34 |
| 가. primary fat cell의 분리 | 34 |
| 나. primary fat cell의 배양 | 35 |
| 2. 중성지방의 측정 | 37 |
| 3. lipoprotein lipase(LPL) activity 측정 | 37 |
| | |
| 제 2절 결과 및 고찰 | 38 |
| 1. CLA가 배양된 세포의 중성지방 함량에 미치는 영향 | 38 |
| 2. CLA가 배양된 세포의 LPL activity에 미치는 영향 | 42 |
| | |
| 제 5장 CLA 급여가 돼지의 지방축적에 미치는 영향 | 44 |
| 제 1절 재료 및 방법 | 44 |
| 1. 사료배합에 이용된 CLA의 공급원 | 44 |
| 2. 시험구 및 공시가축 | 44 |
| 3. 시험사료 배합 및 급여 | 45 |
| 4. 조사항목 | 39 |
| 5. 돼지 지방조직의 지방산 분석 | 46 |
| 6. 돼지 지방조직 절편의 지방합성량 측정 | 47 |
| 가. Incubation buffer 제조 | 47 |
| 나. 등지방조직의 biopsy와 지방합성 측정 | 47 |
| 다. 지방추출 및 지방합성량 계산 | 48 |
| 7. 지방조직의 지방합성 관련 효소의 activity 측정 | 48 |
| 8. 지방분해(lipolysis)의 측정 | 48 |

| | |
|---|----|
| 9. 혈중 cholesterol 함량 측정 | 49 |
| 제 2절 결과 및 고찰 | 49 |
| 1. 돼지의 성장생산성 | 49 |
| 2. 지방조직의 지방산 조성 | 50 |
| 3. 지방조직의 지방합성 및 lipogenic enzyme activity | 51 |
| 4. 지방조직의 지방분해(lipolysis) | 53 |
| 5. 혈중 cholesterol 함량 | 54 |
| 제 6장 결론 | 57 |
| 제 7장 참고문헌 | 58 |

제 1장 서 론

1987년에 위스콘신 대학교의 Dr. Piraza group이 CLA(Conjugated Linoleic Acid)가 항암작용이 있다고 발표한 이래(Ha 등, 1987) CLA에 관한 연구논문이 쏟아져 나오고 있다. 그 이유는 이 CLA가 항암작용(Ip 등, 1994 ; Ip 등, 1999 ; Belury 등, 2002) 뿐만 아니라 항동맥경화(Lee 등, 1994), 항비만(Thiel 등, 2001 ; Corino 등, 2002; Evans 등, 2002 ; Hargrave 등, 2002), 항당뇨 및 면역증강작용(Cook 등, 1993 ; Kelly 등, 2002)이 여러 실험에 의해 확인되어 인간의 건강증진에 이용될 수 있을 가능성이 크기 때문이다. 한편 축산물 생산의 입장에서는 저지방 고기생산, 면역증강에 의한 생산성 향상, 그리고 CLA가 다량 함유된 축산물 섭취에 의한 건강증진 등이 논의의 대상이다.

CLA는 LA(linoleic acid)의 이성체로서 이중결합의 위치 그리고 cis 또는 trans form에 따라 여러 이성체가 생긴다. 즉 LA는 이중결합이 9번과 12번 탄소에 있고 모두 cis form인데 비해 CLA는 이중결합의 위치가 여러 곳에 있을 수 있는데, 주로 논의의 대상이 되는 CLA는 이중결합이 9번과 11번, 그리고 10번과 12번 탄소에 있고, 이것으로부터 8개의 이성체가 생길 수 있다(cis 9 - cis 11, cis 9 - trans 11, trans 9 - cis 11 및 trans 9 - trans 11, 그리고 cis 10 - cis 12, cis 10 - trans 12, trans 10 - cis 12 및 tran 10 - trans 12). 중요한 사실은 여러 CLA가 반추가축의 생산물, 즉 쇠고기, 우유, 치즈 등에 많이 함유되어 있다는 것이다. 즉 반추 미생물에 의해 인간에 유익한 CLA가 생성되는 것이다(An 등, 2003 ; Baumgard 등, 2002). 위의 여러 이성체중에서 유제품에 많은 것은 cis 9 - trans 11 CLA이다(Ip 등, 1994).

Ip 등 (1994)은 CLA의 항암작용이 매우 specific해서 어유에 비해 매우 적은 양으로 항암작용이 나타난다고 했는데, 예로 쥐에서 항암작용을 가져 오기 위해서 어유는 사료중에 10%가 함유되어야 하는데 비해 CLA는 0.1%만 함유해도 항암작용을 나타낸다고 했다. 이것은 사람의 경우 하루에 3.5g 정도만 섭취해도 항암작용에 CLA가 도움이 될 것이라고 예측했다. 이런 사실은 식품 첨가물로서의 사용 가능성을 강하게 시사해 주고, 이미

시판되어 사용되고 있기도 하다. 본 연구에서는 축산물의 질 향상 즉 지방 축적억제에 관련된 것만 논의하고자 한다.

CLA는 이미 생쥐(West 등, 1998), 쥐(Sisk 등, 1998), 및 돼지(Dugan 등, 1997 ; Ostrowska 등, 1999)에서 지방축적을 억제하는 것이 확인되었다. 여러 농도의 CLA를 급여했고, 도체 성분 및 1일 지방 및 단백질 축적량 등을 광범위하게 조사한 Ostrowska 등 (1999)의 연구결과를 요약하면 다음과 같다. 1) CLA의 여러 농도, 사료중 0.125 ~ 1% 범위에서 모두 CLA는 지방축적 억제작용을 나타냈다. 2) 그러나 사료효율 개선과 단백질 축적량 향상 효과는 크지 않았다. 3) 지방합성이 억제되었을 것이라고 추측되나 CLA의 지방축적 억제작용에 대한 기전은 확실하지 않았다 등이다. 위에서 설명한 대로 지방축적 억제작용은 CLA의 매우 두드러진 작용이고, 또 이것은 인간의 식품으로 이용될 때도 비만억제에 의한 성인병 예방, 가족에게는 지방이 적은 고기 생산이 가능하므로 CLA의 지방세포 증식 및 지방합성에 미치는 영향을 포함한 지방축적에 미치는 영향 전반에 대한 연구수행의 중요성이 커졌다. Park 등 (1999)은 CLA 이성체중에서 trans 10 - cis 12 CLA가 3T3 L1 cell의 LPL의 작용을 감소시키고, 중성지방의 배출을 증가시켰으나 cis 9- trans 11 CLA는 위와 지방축적억제관련 작용이 없었다고 했다. 지금까지 수행된 많은 CLA 관련 연구가 단일이성체가 아닌 여러 이성체가 섞인 CLA를 사용했기에 어느 이성체가 특정작용을 가지는지를 확인하는 것이 불가능하다. 가축의 생산성 향상이나 인체의 건강증진을 위해 CLA가 사용될 경우 개개 이성체의 작용을 확실하게 구명하는 것이 중요하다. 같은 3T3 L1 Cell 이용한 실험에서 Satory와 Smith (1999)는 CLA가 세포증식을 억제하고, 세포분화는 촉진시켰다고 보고했다. 한편 Brodie 등 (1999)은 preconfluent와 postconfluent로 구분해서 수행한 연구에서 CLA가 3T3 L1 cell의 분화를 모두 억제했지만, 증식은 preconfluent 시기에서만 억제하고 postconfluent 시기에서는 아무 작용이 없었다고 해서 상반된 결과를 보여 주고 있다. 그들이 사용한 CLA가 여러 이성체의 mixture였기 때문에 CLA 이성체의 조성이 다른 것이 상반된 결과의 일부 이유라고 짐작이 된다. 이런 상황에서 과연 어느 특정 CLA 이성체가 지방세포의 증식 또는 분화를 억제하는지? 또는 지방축적에 관여

하는 효소 등에는 어느 이성체가 그 작용정도가 큰지 등의 구명이 필요하다.

앞으로 화학적인 방법에 의해 (Chen 등, 1999 ; Eulitz 등, 1999) 또는 CLA 합성에 관여하는 효소의 gene 조작에 의해 여러 종류의 CLA 이성체가 값싸게 대량으로 생산될 수 있고 또 이것이 인간의 식품첨가제 또는 가축의 사료첨가제로 이용될 가능성이 커졌다. 국내의 몇몇 회사에서 이미 CLA를 생산하고 있다. 그런데 어느 CLA isomer 또는 어느 회사에서 제조한 특정 batch의 CLA를 가축에게 급여했을 때 지방축적을 억제하는지를 신속, 정확하게 측정하는 방법의 개발이 절실하다. 왜냐하면 생산된 CLA를 100 ~ 200 두의 돼지를 이용해서 2개월간 실험하기가 쉽지 않기 때문이다. 그리고 위에서 언급한 몇몇 연구들이 상반된 결과를 보였고, 그리고 지금까지 수행한 모든 연구들이 종합적으로 CLA의 작용을 구명하지 못했다. 그래서 본 연구에서는 1) 지방세포 배양에서 어느 CLA 이성체가 분화를 억제하는지를 구명하고 2) 세포배양 연구에서 지방세포의 분화를 억제한 CLA를 돼지에게 급여해서 돼지에서 지방축적을 억제하는지를 구명하고 3) 세포배양 및 사양실험 결과를 종합해서 돼지에서 CLA 역가관정 방법을 확립하려 한다.

제 2장 CLA가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향

Primary cell은 살아있는 동물로부터 세포를 분리해 내야하고 계대배양이 불가능하므로, 질소 tank에 cell을 보관할 수 있고 거의 무한정으로 계대배양할 수 있는 cell line을 세포분화 연구에 사용하는 경우가 많다. 그중에서 3T3-L1 cell은 지방세포 분화의 연구를 위해 광범위하게 이용되고 있는 cell line이다(Green과 Kehinde, 1974 ; Loffler와 Hauner, 1987). 본 연구에서는 3T3-L1 cell을 6-well plate에 seeding해서 분화(differentiation)까지 여러 CLA 이성체를 여러 농도, 여러 시기에 처리해서 과연 어느 이성체가 지방세포의 분화를 억제 또는 증가시키는지 구명하는 것이 주목적이다. 연구계획서에는 증식(proliferation)과 분화(differentiation)를 따로 기술했지만 실제 실험에서는 둘을 분리하기가 어려워서 여기서는 함께 기술한다.

제 1절 재료 및 방법

1. CLA 준비 및 대조구

CLA는 Matrerya(Pennsylvania, USA)에 구입했으며 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 50mM 농도로 희석해서 N₂ gas로 충전해서 -70℃에서 보관했다. 6-well plate가 1 well 당 2ml을 함유하므로 media를 교환할 때 2ul의 50mM CLA를 첨가해서 50uM의 농도가 되게 했다. 대조구는 CLA를 희석하는데 사용된 같은 부피의 DMSO를 첨가한 구를 사용했다.

2. 세포배양

세포배양은 Chen 등(1997)의 방법을 약간 변형시켜 실험하였다. 분화유도 6일전(day -6)에 3T3-L1 지방전구세포를 6-well tissue culture plates에 3×10^4 cells/well로 seeding 하고, 10% FBS를 포함한 DMEM으로 day 8까지 14일동안 2알 간격으로 배양액을 갈아주면서 37℃ · 5% CO₂

incubator에서 배양시켰다. 분화를 유도시키기 위해서(분화유도일 day 0) DMEM에 100 nmol/L insulin(INS), 1 μ M dexamethasone(Dex), 0.5nmol/L isobutyl-methylxanthine(IBMx)를 함유시켰고, day 2에는 같은 양인 100 nmol/L INS만 함유시켰다. 대조군으로 CLA를 희석하는데 사용된 DMSO를 처리하고, 각 처리·시기에 따라 CLA를 처리하였다. Fig. 1은 seeding(day -6) 후 시간이 지남에 따라 3T3-L1 지방전구세포의 증식과 분화의 과정을 잘 보여주고 있다.

3. 세포분화 측정

3T3-L1 지방전구세포의 분화는 sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH; EC 1.1.1.8)를 측정함으로써 구명했는데, GPDH의 측정은 배양 마지막 날인 day 8에 시행하였다. 6-well plate의 배양액을 제거하고 PBS로 헹구어낸 후, 270 μ l homogenizing buffer(pH 7.4 HB; 0.25M sucrose, 5mM Tris base, 1mM EDTA, 1mM dithiothreitol)로 6-well plate의 세포를 scrapping 하여 1.5ml eppendorf tube에 수집해 얼음 위에 꽂아두었다. 다음으로 6 watt로 10초동안 세포를 sonication(Sonics & Materials, Inc.)시켜 12,000 RPM으로 4 $^{\circ}$ C에서 10분동안 원심분리 시켰다. 200 μ l supernatant를 취해 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 0.8ml assay buffer(triethanolamine, β -mercaptoethanol, β -nicotinamide adenine dinucleotide), 100 μ l substrate(dihydroxyacetone phosphate lithium solution) 그리고 150 μ l sample를 UV cuvette [Cuvettes semi UV(14-385-938)]에 넣어 흔들어진 후 spectrophotometer(SHIMADZU, UV-Visible Spectrophotometer, UV-1601)를 이용해 340nm에서의 OD 변화로 GPDH 활성을 측정했다. GPDH는 dihydroxyacetone phosphate를 glycerol-3-phosphate로 전환시키는 효소로, glycerol-3-phosphate는 triacylglycerol(TG) 합성의 원료가 되기 때문에 세포주든 1차 세포든 지방전구세포의 분화정도를 측정하는데 널리 이용되는 방법이다. UV 측정시에는 dihydroxyacetone phosphate lithium(DAPL)이 NADH를 얼마나 산화시키는지 측정 해서 조사한다.

단백질 측정은 Bradford와 Marion(1976)의 방법에 따라, solution

B(coomassie brilliant blue G, phosphoric acid, 95% ethanol) 900 μ l와 sample 5 μ l를 UV cuvette에 넣고 흔들어진 후 spectrophotometer를 이용해 590nm에서 값을 측정했다.

4. 세포수와 세포의 DNA 함량 측정

Day -6에 1.8×10^4 cells/well로 96-well plate에 seeding과 동시에 50 μ M 여러 CLA 이성체를 처리하고 day -4에 media를 교환하고 CLA를 처리하고, day -2에 Roche 제품 kit(#1 644 807)를 이용해서 tetrazolium salt WST-1 (4 - [3 - (4-iodophenyl) -2 - (4-nitrophenyl)-2H-5- tetrazolio] -1,3-benzene disulfonate)(WST-1)의 분해량에 근거해서 측정하였다. 세포의 DNA 함량은 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)의 incorporation 되는 양을 역시 Roche 제품 kit(# 1647 229)를 이용해서 측정했다.

5. 통계처리

본 연구의 모든 실험 데이터는 student t-test를 이용하여 대조군에 대한 각 처리군을 비교분석 하였고, P값이 0.05이하인 것을 유의성 있는 것으로 간주하였으며 모든 분석과정은 the GLM procedure of the Statistics Analysis System(SAS Institute, Cary, NC. 1988)을 이용하였다.

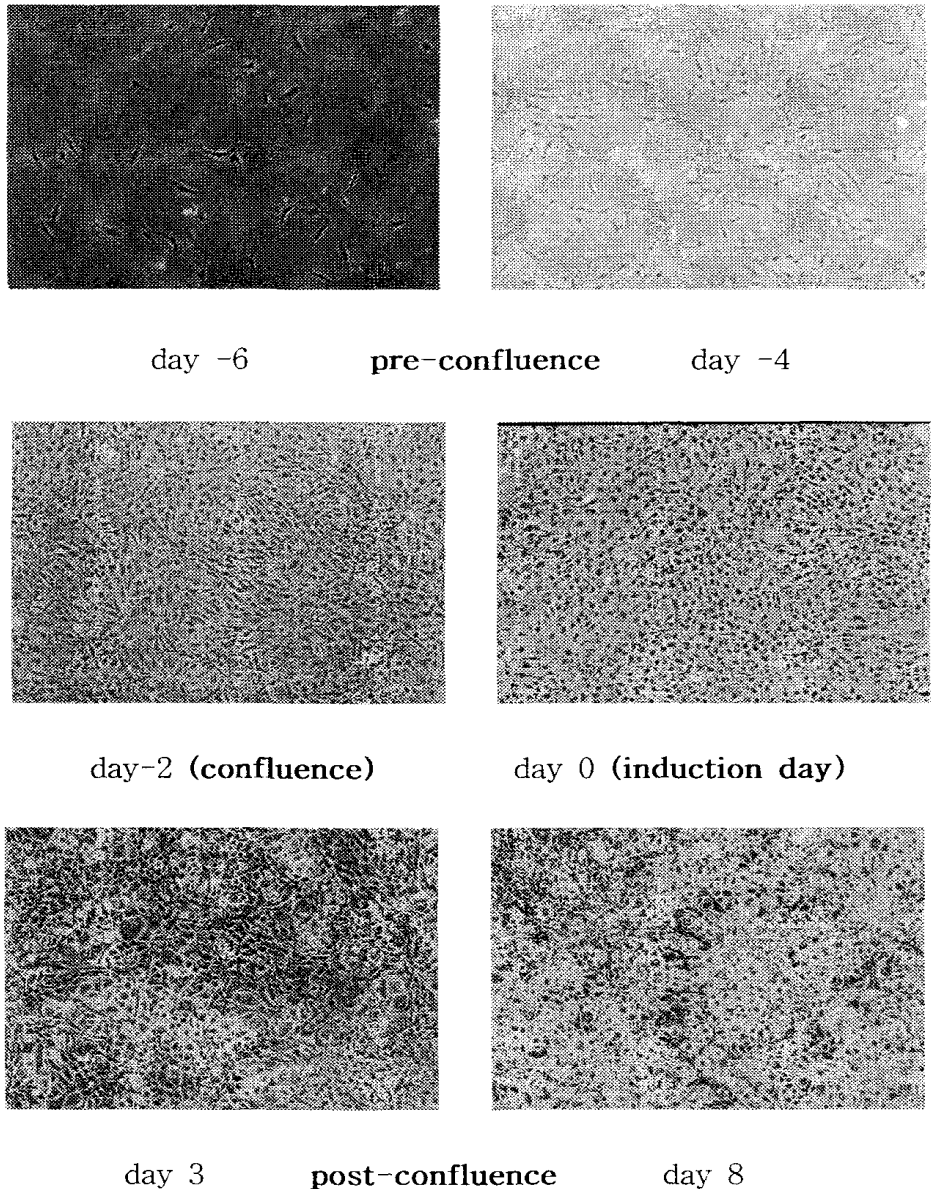


Figure 1. Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The cells were plated on 6-well plate at a density of 3×10^4 cells/well in DME medium plus 10% FBS.

제 2절 결과 및 고찰

1. 3T3-L1 cell의 배양방법 확립

본 연구의 세포배양은 Chen 등(1997)의 방법을 약간 변형시켜 수행하였다. Day 0에 1 μ M Dex, 0.5nmol/L IBMX 및 100nmol/L INS를 처리하고 day 2에는 50, 100nmol/L INS만 처리하여 분화를 비교한 결과(data not shown), 100nmol에서 분화정도가 높아 day 2에 day 0과 같은 양인 100nmol/L INS을 사용하였다. 분화정도를 높이기 위해서 본래의 cell density인 3 \times 10⁴ cells/well에서 5 \times 10⁴ cells/well로 증가시켰으나, 분화정도에 차이가 없고 세포의 발달을 육안으로 명확하게 확인할 수 있어서 원래의 3 \times 10⁴ cells/well로 실험을 진행하였다(data not shown).

2. CLA 처리시기가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향

최근에 몇몇 연구에 의해 지방세포의 분화억제작용을 가진 것으로 알려진 trans-10, cis-12(10t-12c) 20 μ M을 3시기 즉 분화유도전(day -6~0), 분화유도후(day 0), 및 분화전기간(day -6~8)에 걸쳐 처리했을 때 분화유도 전에는 10t-12c가 세포분화를 억제하지 않았는데 분화유도후와 배양전기간에 처리했을 때 세포분화를 크게 억제했다(Fig. 2). 이 사실은 10t-12c CLA 이성체의 분화억제작용은 세포수의 증식보다는 분화과정에 영향을 미치기 때문으로 사료된다. 10t-12c의 처리시기별 작용을 더 세밀히 구명하기 위해서 day -6에서 day 8까지 2일 간격으로 20 μ M 10t-12c를 처리했는데 분화억제작용이 없었다(Fig. 3). 이에 대한 이유는 처리기간이 너무 짧았던(2일) 것이 그원인으로 사료된다.

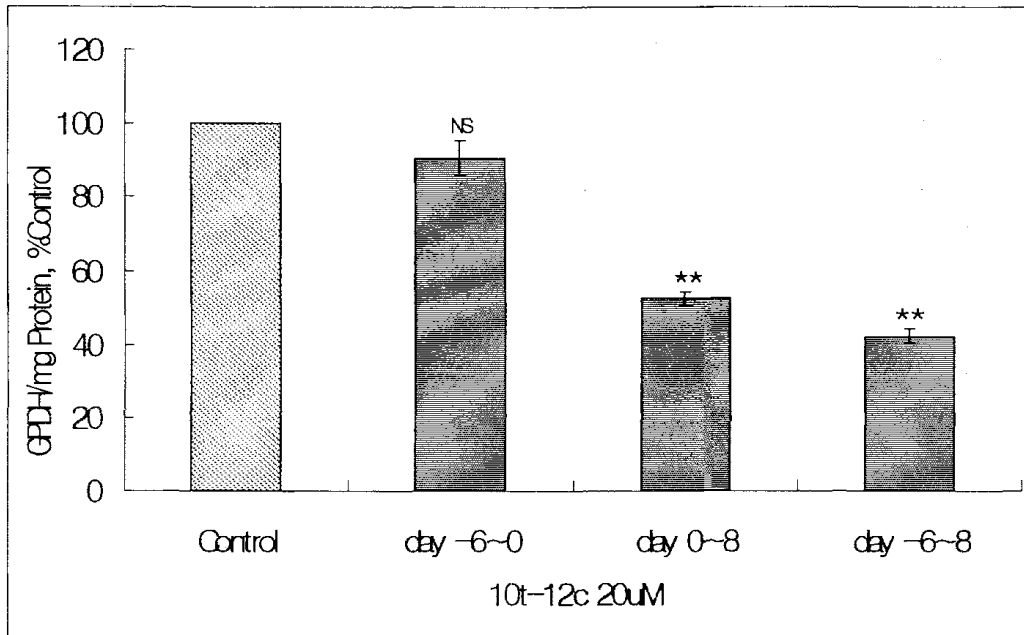


Figure 2. Effect of treatment time of 10t-12c(20uM) on differentiation of 3T3-L1 cell. Reported values are mean \pm S.E. (n = 4) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells. (^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

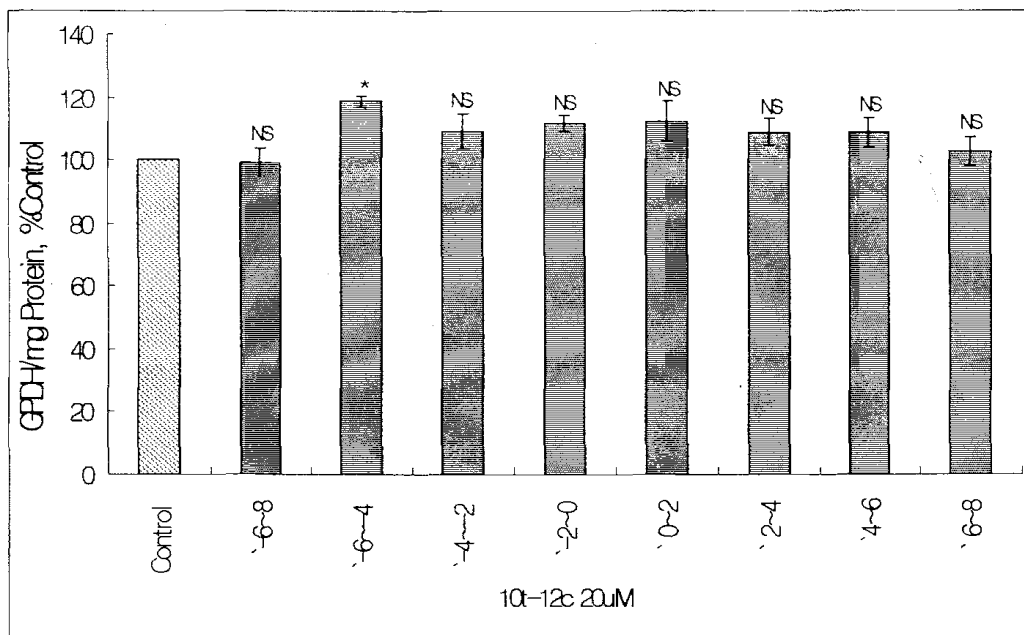


Figure 3. Effect of treatment interval of CLA on differentiation of 3T3-L1 cell. Twenty μ M of 10t-12c was treated for the indicated day. Reported values are mean \pm S.E. (n = 4) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

3. CLA 이성체 종류가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향

본 연구실에서 획득이 가능했던 CLA 이성체인 9c-11c, 9c-11t, 9t-11t, 10t-12c 및 CLA mixture(10t-12c 44% 함유)를 50uM의 농도로 3시기(day -6~0, 0~8, -6~8)에 처리했을 때 세포분화에 미치는 영향이 Table 1과 Fig. 4, 5 및 6에 나타나있다. 증식기(분화유도전 즉 day -6~0)에는 9t-11t 및 10t-12c의 세포분화 억제효과가 뚜렷했으나, 나머지 이성체의 작용은 뚜렷하지 않았다(Fig. 4). 그리고 분화기(day 0~8)에는 9t-11t와 10t-12c의 분화억제작용이 더욱 뚜렷했고($P < 0.001$), 특이한 것은 9c-11c는 세포분화를 촉진했다. CLAmix도 분화를 억제했는데 이것의 억제작용은 CLAmix에 포함되어 있는 10t-12c(44%) 때문으로 사료된다(Fig. 5). 세포배양전기간(day -6~8)에 여러 CLA를 처리한 결과가 Fig. 6에 나타나 있는데 10t-12c의 분화억제작용과 9c-11c의 분화촉진작용이 더욱 뚜렷했다. 이상의 결과는 CLA 여러 이성체의 지방세포분화 억제 및 촉진작용은 세포의 증식기보다 분화기에 그 작용이 뚜렷하고 또 투여기간이 길수록 뚜렷함을 나타낸다.

Brodie 등(1999)도 10t-12c를 함유한 CLAmix가 3T3-L1 cell의 분화를 억제했다고 보고했으나 9c-11c가 분화를 촉진한 결과를 나타낸 것은 본 연구가 처음인 것으로 여겨진다. 이 사실은 CLA의 특정작용을 구명하기 위해서는 개개 이성체를 사용해야지 소기의 목적을 달성할 수 있음을 나타낸다.

Table 1. Effect of various CLA isomers on differentiation of 3T3-L1 cells.

| Treatment (50 μ mol) | GPDH/mg protein, % control ¹ | | |
|-----------------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|
| | day -6~0 | day 0~8 | day -6~ 8 ² |
| Control | 100 | 100 | 100 |
| 9c-11c | 90.35 \pm 4.57 ^{NS} | 137.51 \pm 1.62 ^{**} | 143.50 \pm 2.34 ^{**} |
| 9c-11t | 100.70 \pm 3.92 ^{NS} | 122.03 \pm 1.88 [*] | 117.21 \pm 3.54 [*] |
| 9t-11t | 61 \pm 5.85 ^{**} | 50.77 \pm 3.28 ^{***} | 75.31 \pm 5.84 ^{**} |
| 10t-12c | 69.88 \pm 5.22 ^{**} | 50.44 \pm 1.35 ^{***} | 11.21 \pm 1.28 ^{***} |
| CLAmix | 86.98 \pm 2.56 [*] | 69.62 \pm 1.29 ^{**} | 61.65 \pm 2.96 ^{**} |

¹ Reported values are mean \pm S.E. (n = 12, collected from three independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

² Treatment Interval : day -6~0, 0~8, -6~8

(^{NS} : not significant * : P 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.05

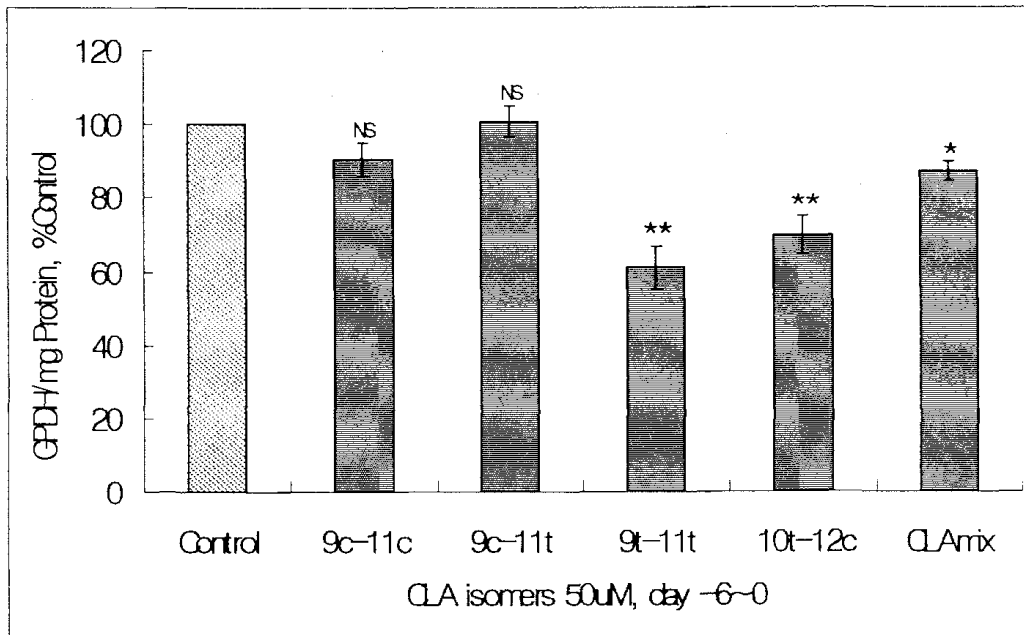


Figure 4. Effect of various CLA isomers on differentiation of 3T3-L1 cells. CLAs were treated for day -6~0. Reported values are mean \pm S.E. (n = 4) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

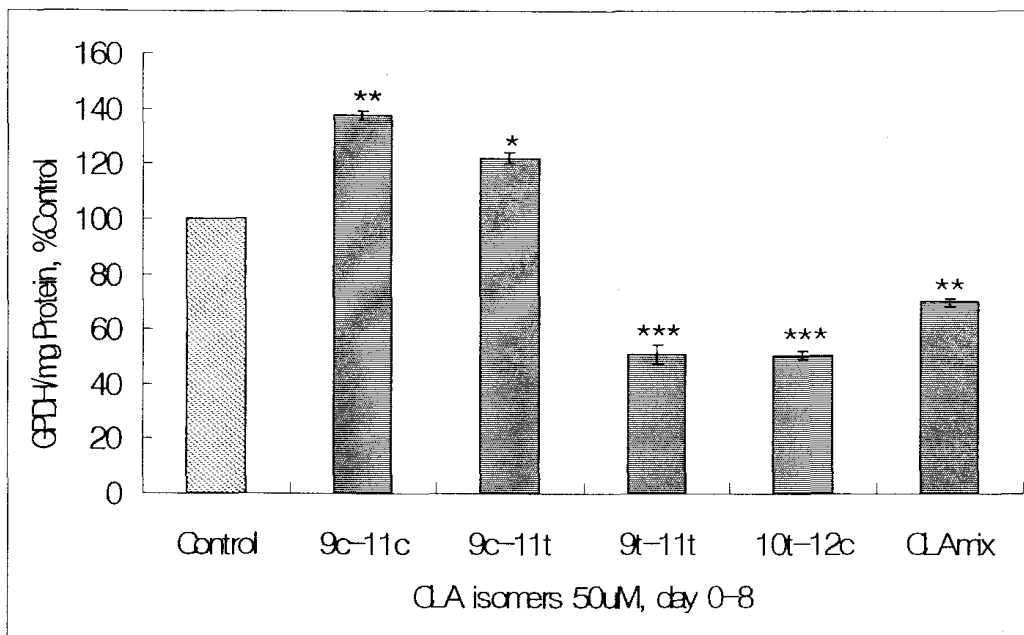


Figure 5. Effect of various CLA isomers on differentiation of 3T3-L1 cells. CLAs were treated for day 0~8. Reported values are mean \pm S.E. (n = 4) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(* : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

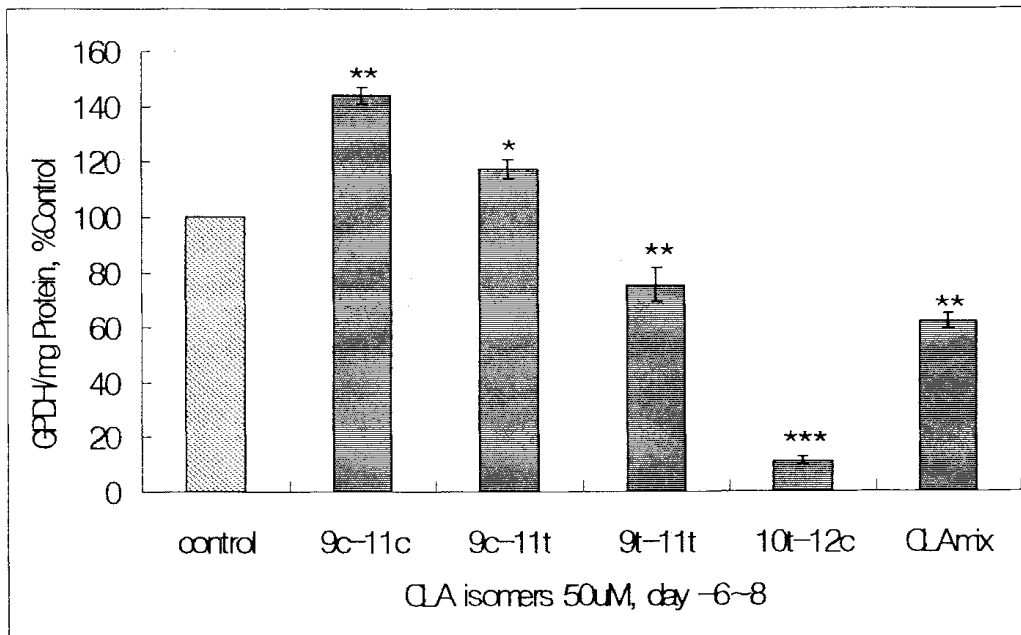


Figure 6. Effect of various CLA isomers on differentiation of 3T3-L1 cells. CLAs were treated for day -6~8. Reported values are mean \pm S.E. (n = 4) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.
 (* : P < 0.05 ** : P < 0.01 **** : P < 0.001

4. CLA의 농도가 3T3-L1 cell의 분화에 미치는 영향

지방세포의 분화 억제 및 촉진작용을 나타냈던 9c-11c, 10t-12c 및 CLAmix를 이용해서 0(대조구), 20uM, 50uM 및 100uM을 처리했는데 100uM의 경우 10t-12c 및 CLAmix는 세포사멸현상이 일어나서 data로 표시할 수 없어서 20uM과 50uM를 비교했다. Fig. 7에 나타난대로 9c-11c의 분화촉진효과는 50uM이 20uM 보다 더 컸고 10t-12c와 CLAmix의 분화억제작용도 50uM이 20uM보다 더 컸다.

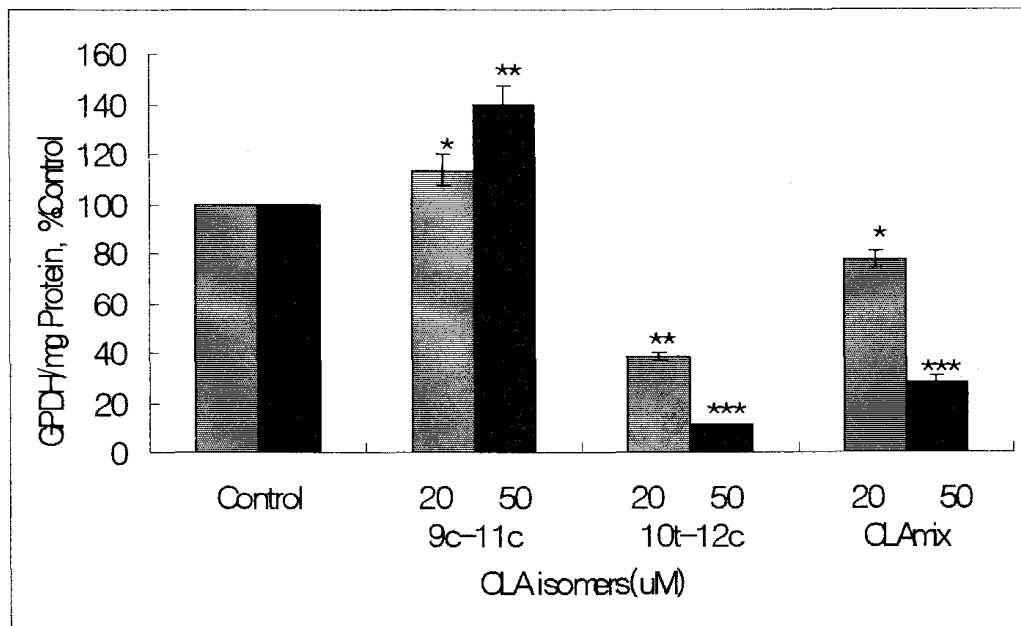


Figure 7. Effect of concentrations of CLA on differentiation of 3T3-L1 cells. CLAs were treated for day -6~8. ; Difference from DMSO-treated control cells.

(* : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

CLAmix의 지방세포의 분화억제작용이 10t-12c에 비해 약간 떨어지는데 이 사실은 CLAmix의 작용이 이것에 포함된(44%) 10t-12c의 작용임을 암시해 준다. 본 연구의 결과 즉 10t-12c와 CLAmix의 지방세포분화 억제

작용이 뚜렷했는데, 이 사실은 돼지 사양실험에서 지방축적억제 목적으로 10t-12c와 CLAmix가 적합함을 말해준다.

5. CLA가 3T3-L1 cell의 세포수와 DNA 함량에 미치는 영향

CLA의 3T3-L1 cell의 분화억제 작용 구멍의 일환으로 세포증식기(세포 분화유도전 day -6~-2)에 여러 CLA를 처리했을 때 세포수와 DNA 함량에 미치는 영향이 Fig. 8과 Fig. 9에 나타나 있다. 앞에서 설명한 대로 세포분화를 크게 억제했던 10t-12c와 CLAmix구의 세포수가 크게 감소되었는데, 세포분화를 촉진했던 9c-11c구는 세포수를 증가시키지 않았다. 이 사실은 CLA의 3T3-L1 cell의 작용이 세포의 증식보다는 분화에 더 크게 영향을 미침에 의한 결과임을 나타내는데, 이를 뒷받침해 주는 증거로 앞에서 설명한대로(Fig. 4와 Fig. 5) CLA를 분화유도후(day 0~8)에 처리했을 때가 분화유도전(day -6~0)에 처리했을 때보다 그 작용이 더 뚜렷했다. 10t-12c보다 분화억제 작용이 작았던 9t-11t의 세포수의 감소작용이 더 컸다. CLA가 3T3-L1 cell의 DNA 함량에 미치는 영향이 Fig. 9에 나타나 있는데 세포수에 미치는 영향과 비슷했다. 이 사실은 DNA 함량은 세포수에 비례함을 나타내고, 본 연구에서 사용한 세포수와 DNA 함량 측정방법이 타당했음을 나타낸다.

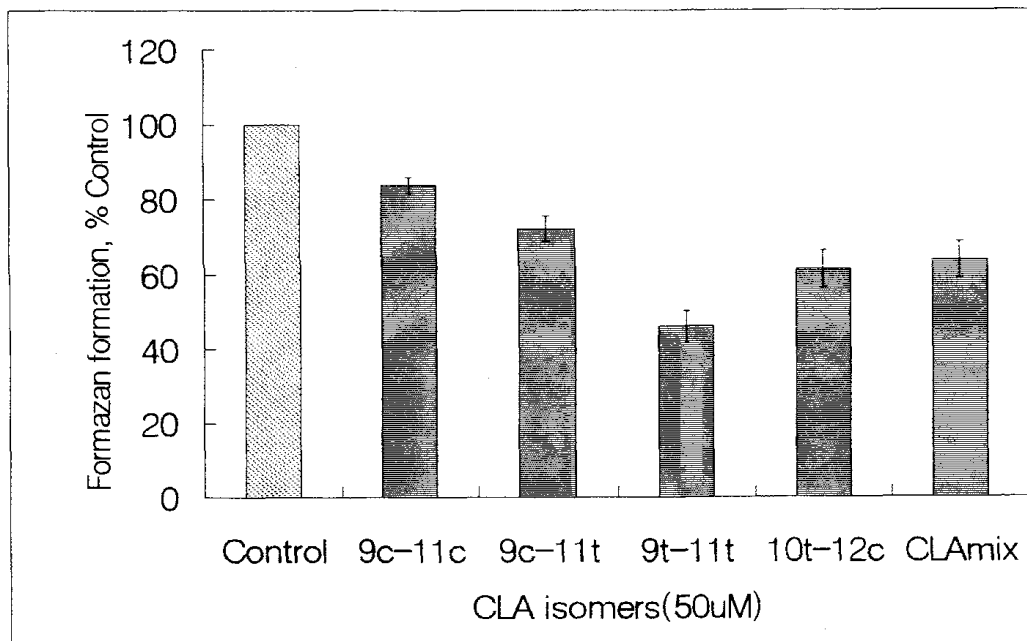


Figure 8. Effects of CLA on cell number of 3T3-L1 cell. Cells were treated with 50uM CLA in pre-confluent period(day -6~-2). Reported value are mean \pm SE ; difference from DMSO-treated control cells.

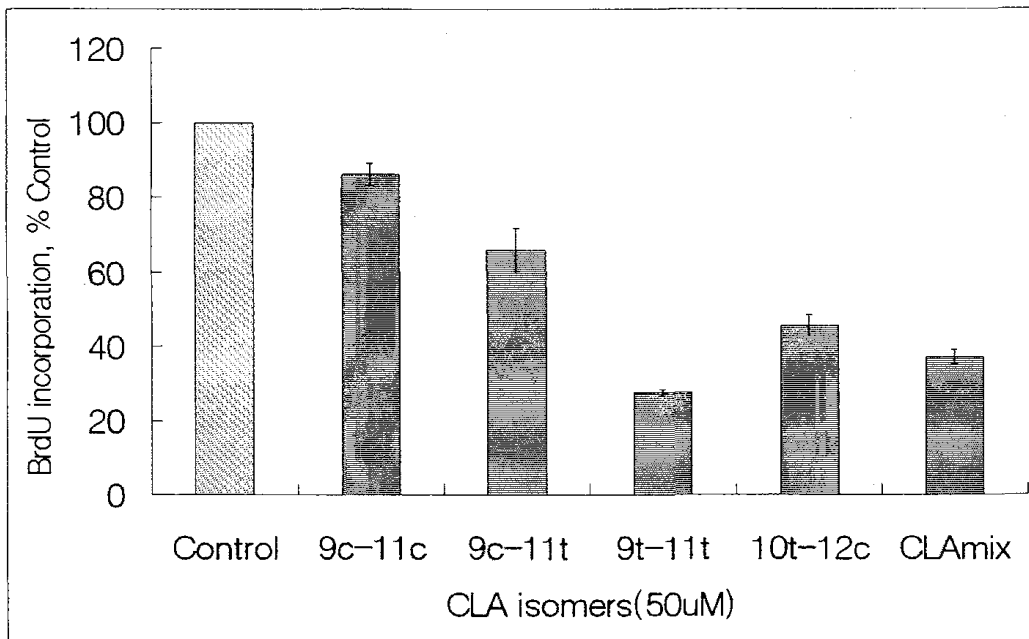


Figure 9. Effects of CLA on DNA content of 3T3-L1 cell. Cells were treated with 50uM CLA in pre-confluent period(day -6~-2). Reported value are mean \pm SE ; difference from DMSO-treated control cells.

제 3장 CLA가 근육세포의 분화에 미치는 영향

지금까지의 많은 CLA에 관한 연구들이 개개의 CLA 이성체보다는 여러 CLA 이성체 혼합물을 사용해왔는데 이것의 문제점은 과연 어느 이성체가 효능이 있는지를 파악하기 어려웠다. 그래서 본 연구의 제 2장에서는 개개 CLA 이성체가 지방세포의 분화에 미치는 영향을 구명했는데 3장에서는 지방세포의 분화를 억제 또는 촉진시킨 이성체가 근육세포에서도 비슷한 효능을 나타내는지를 구명하는 것이 주목적이다. 지방세포 분화는 억제하고, 근육세포의 분화를 촉진시키는 CLA 이성체가 확인된다면 가축의 생산성 향상을 위해서는 이상적일 것이다.

제1절 재료 및 방법

1. cell line

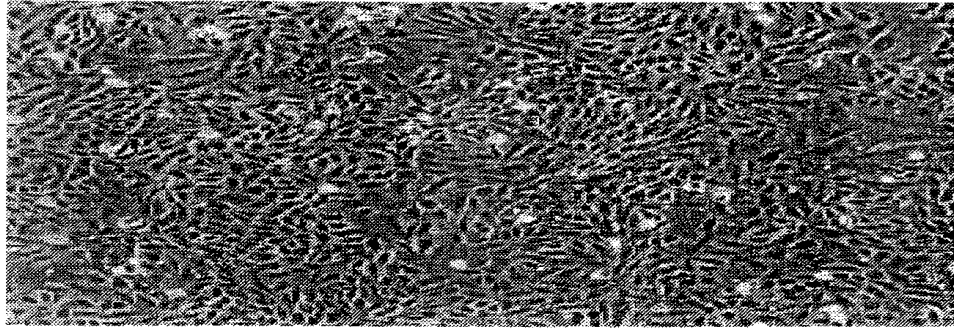
본 연구에 사용한 L8 cell line은 1969년에 newborn non-inbred Wistar rats로부터 분리해낸 primary skeletal muscle cell을 여러 세대를 거쳐 만들어 낸 것으로, American Type Culture Collection(Rockville MD, USA)의 제품을 사용했다.

2. CLA 준비 및 대조구

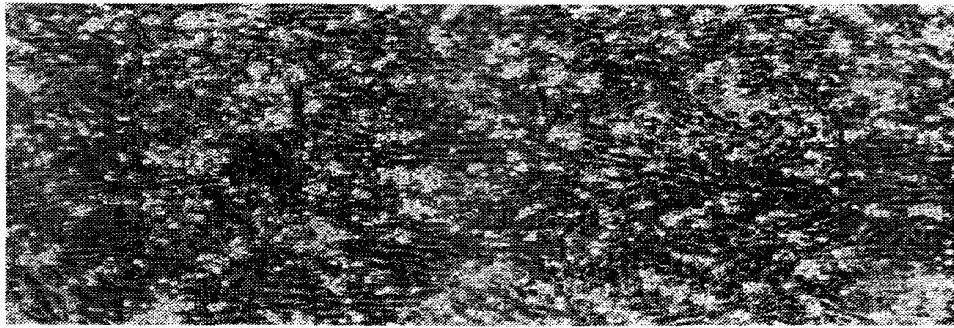
CLA는 Matrerya(Pennsylvania, USA)에 구입했으며 DMSO로 50mM 농도로 희석해서 N₂ gas로 충전해서 -70℃에서 보관했다. 6-well plate가 1 well 당 2ml을 함유함으로써 media를 교환할 때 2ul의 50mM CLA를 첨가해서 50uM의 농도가 되게 했다. 대조구는 CLA를 희석하는데 사용된 같은 부피의 DMSO를 첨가한 구를 사용했다.

3. 세포배양

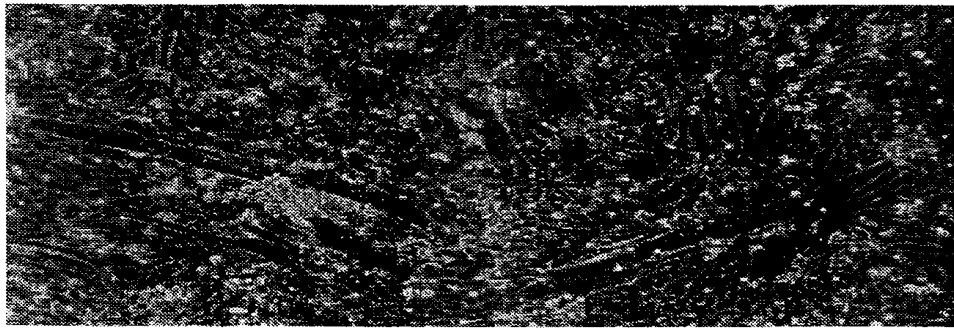
6-well plate에 L8 cell을 1×10^5 cells/well로 seeding했고, 사용한 media는 DMEM(low glucose, Gibco 31600-034)였는데 분화유도전에는 여기에 10% FBS를 첨가했고, 10% FBS 대신에 2% horse serum 첨가함으로써 분화를 유도했다. 2일마다 media를 교환했다. 분화유도일을 day 0으로 정했고 분화유도 2일전 즉 day -2에 cell을 seeding 했다. 대개 day 6에 근육세포의 분화가 완료되었는데 지방세포와는 달리 여러 근육세포가 모여서 융합(myotube 형성)해서 길쭉한 모양을 나타내었다. Fig. 1에는 L8 세포의 분화가 진행되면서 변형되는 모양을 잘 보여준다.



day 0



day 3



day 5

Figure 1. Differentiation of L8 cells cultured on DMEM + 10% FBS. Day 0 indicates the time when L8 cells were induced for differentiation with DMEM + 2% horse serum ; day 3, 3 days after induction ; day 5, 5 days after induction. L8 cells on day 5 showed formation of myotube..

4. 세포분화 측정

L8 근육세포의 분화정도는 creatine kinase(CK) 활성도를 측정함으로써 구명했는데, CK 측정방법은 culture 마지막 날인 day 6에 시행하였다. cell culture가 끝난 후 6-well plate에 있는 media를 완전히 제거하고 PBS로 남아있는 media를 씻어낸 후 500 μ l lysing buffer(LB: 25 mM Tris, 10 mM KCl and 1 mM MgCl₂ for 100 ml at pH 7.4)를 이용하여 6-well plate에서 cell을 1.5ml eppendorf tube에 수집한 후 얼음 위에 꽂아 두었다. 다음으로 10초 동안 6 watts로 cell을 sonication(Sonics & Materials, Inc.) 시킨 후 4 $^{\circ}$ C 12,000RPM으로 10분 동안 원심분리 시켰다. tube안의 supernatant를 450 μ l 취해서 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 멸균된 증류수 300 μ l, 10ml 멸균된 증류수로 용해된 CK-10 kit(sigma product) 200 μ l와 sample 300 μ l를 1.5ml UV cuvette[Cuvettes semi UV (14-385-938)]에 넣고 Parafilm을 이용해 shaking후 spectrophotometer (SHIMADZU, UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER, UV-1601)를 이용하여 340nm에서 흡광도를 이용해 CK값을 측정했다.

5. 세포수와 세포의 DNA 함량 측정

Day -6에 1.8×10^4 cells/well로 96-well plate에 seeding과 동시에 50 μ M 여리 CLA 이성체를 처리하고 day -4에 media를 교환하고 CLA를 처리하고, day -2에 Roche 제품 kit(# 1644 807)를 이용해서 tetrazolium salt WST-1 {4 - [3 - (4-iodophenyl) -2 - (4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1, 3-benzene disulfonate}(WST-1)의 분해량에 근거해서 측정하였다. 세포의 DNA 함량은 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)의 incorporation 되는 양을 역시 Roche 제품 kit(# 1647 229)를 이용해서 측정했다.

제 2절 결과 및 고찰

1. CLA 이성체의 종류가 L8 cell의 분화에 미치는 영향

본 연구는 CLA 이성체를 근육전구세포(L8 cell)에 처리하였을 때 근육세포 분화에 어떠한 영향을 미치는가를 구명하고자 실시하였다. 50 μ M CLA isomers를 분화유도 전(day -2~0), 분화유도 이후(day 0~6) 그리고 배양 전기간(day -2~6) 등의 3개로 나누어 처리한 결과 지방세포에서와 유사하게 trans-10, cis-12(10t-12c)의 분화억제 효과가 가장 컸으며, 분화유도후 처리가 분화유도전 처리보다 억제효과가 컸다(Fig. 2, 3). 한가지 특이한 사실은 지방전구세포(3T3-L1)의 분화촉진작용을 나타낸 9c-11c가 근육세포의 분화촉진을 억제한 것이다. Fig. 4은 세포배양전기간(day -2~6)까지의 CLA의 작용이 나타나 있는데, 분화유도전(day -2~0)과 분화유도후(day 0~6) 각각 처리했을 때는 억제작용이 적었던 9c-11t, 9t-11t 이성체도 상당한 억제작용을 나타냈다.

본 연구와 CLA가 지방세포의 분화에 미치는 결과를 종합해 보면 10t-12c는 지방세포와 근육세포의 분화를 모두 억제했고, 9c-11c는 지방세포의 분화는 촉진했고, 근육세포의 분화는 억제했는데 이 사실은 CLA는 세포의 종류에 따라 서로 다른 기전에 의해 세포분화에 영향 미침을 알 수 있다. 만약 9c-11c의 작용이 돼지에게 급여했을 때 일어난다면, 돼지의 사료첨가제로서는 피해야 할 CLA 이성체일 것이다.

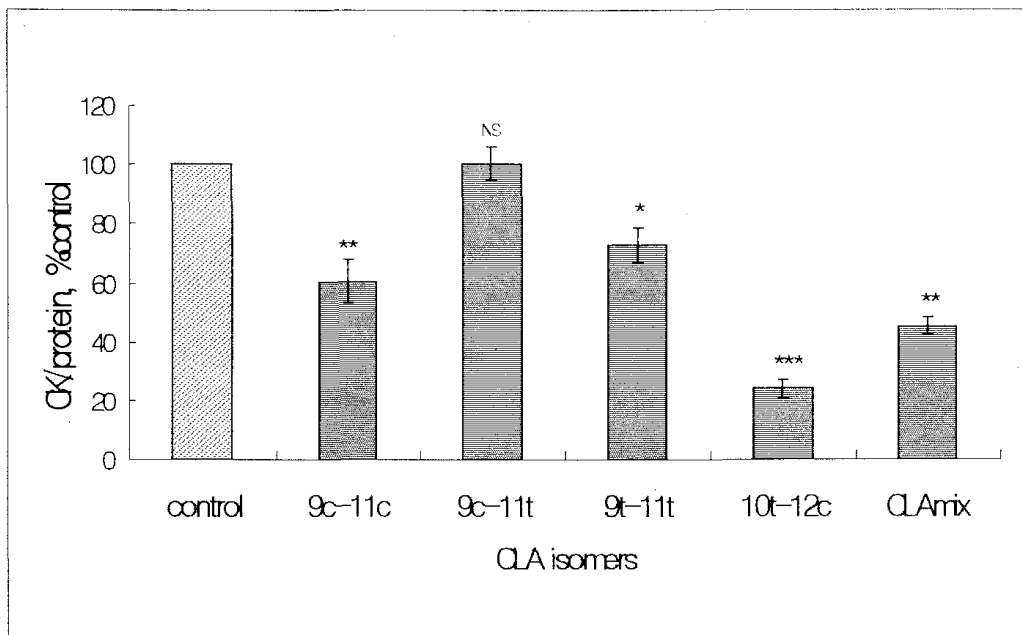


Figure 2. Effect of CLA isomers on differentiation of L8 muscle cell. CLAs were treated for day -2~0. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

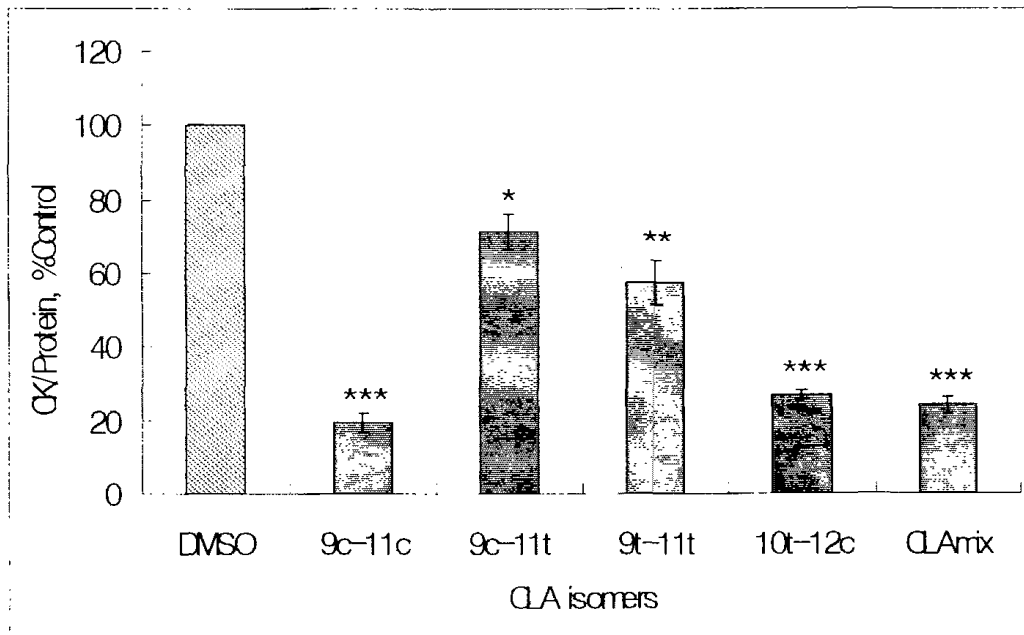


Figure 3. Effect of CLA isomers on differentiation of L8 muscle cell. CLAs were treated for day 0~6. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(* : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

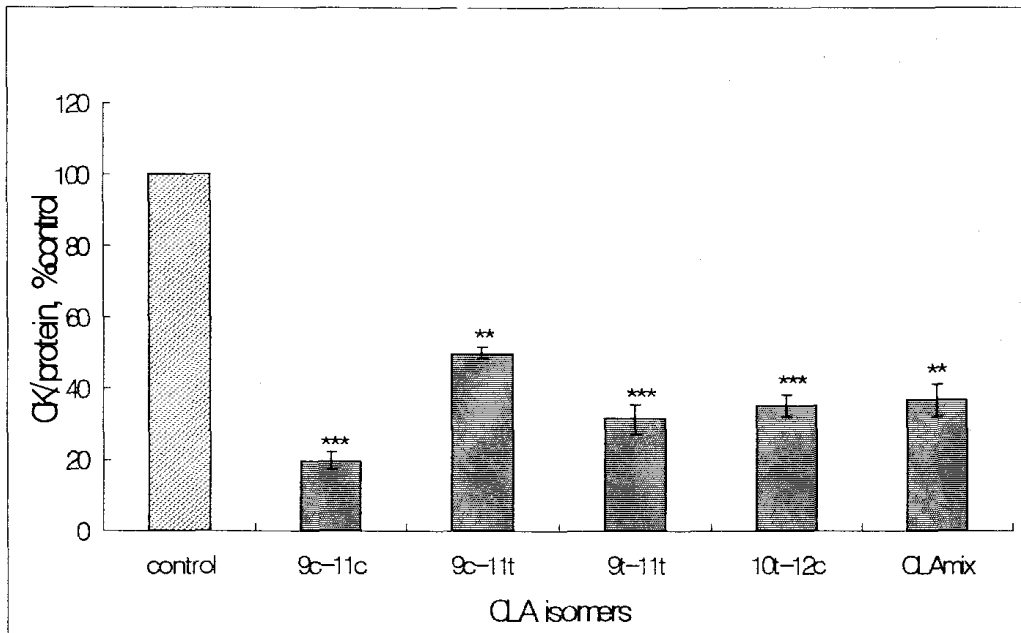


Figure 4. Effect of CLA isomers on differentiation of L8 muscle cell. CLAs were treated for day -2~6. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(* : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

2. CLA의 농도가 L8 cell의 분화에 미치는 영향

CLA의 농도에 따른 작용을 조사하기 위해 여러 CLA 이성체를 여러 농도 0(대조구), 20, 50 및 100uM의 농도로 배양전기간(day -2~8) 처리했는데 100uM의 경우는 세포사멸이 나타나서 결과를 구할 수가 없었다. Table 1에서 보는대로 모든 이성체에서 50uM이 20uM보다 억제정도가 컸으며 10t-12c의 경우 이미 20uM에서 상당히 억제했는데 9c-11c의 경우는 20uM에서 억제정도가 적었고(대조구의 73%) 50uM에서는 억제정도가 커서(대조구의 18%) 두 이성체가 작용하는 양상이 달랐다. 10t-12c를 44% 함유하는 CLAmix의 경우는 예상대로 20uM에서는 10t-12c에 비해 억제정

도가 떨어졌으나 50uM에서는 둘 간에 큰 차이가 없었다. 이는 20uM의 10t-12c만으로 충분히 근육세포의 분화를 억제할 수 있음을 나타낸다.

Table 1. Effect of concentrations of various CLA isomers on differentiation of L8 cells.

| day -2~6 Treatment | CK/mg protein, % control ¹ | |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | 20 uM | 50 uM ² |
| Control | 100 | 100 |
| 9c-11c | 72.74 ± 8.20* | 18.16 ± 2.47*** |
| 9c-11t | 91.76 ± 8.36 ^{NS} | 53.73 ± 5.55** |
| 9t-11t | 38.93 ± 2.96** | 19.51 ± 1.91*** |
| 10t-12c | 18.70 ± 0.39*** | 16.00 ± 1.14*** |
| CLAmix | 29.01 ± 1.26** | 15.78 ± 1.67*** |

¹ Reported values are mean ± S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on triplicate wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

² (^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

3. CLA의 처리시기가 근육세의 분화에 미치는 영향

지방세포나 근육세포에서 확실히 분화억제 현상을 나타냈던 10t-12c 20uM을 이용해서 조사한 처리시기 별 분화억제작용이 Fig. 5에 나타나 있는데 분화전기간(8일)을 2일씩 끊어서 처리한 결과를 나타내고 있다. 분화 후기보다 분화전기에서 억제작용이 더 컸다. 지방진구세포(3T3-L1)는 2일씩 끊어서 CLA를 처리했을 때 억제작용이 없었는데 근육세포는 상당한 억제작용을 나타냈다. 이 사실은 근육세포가 지방세포에 비해 더 CLA에 더 민감하게 반응함을 나타낸다.

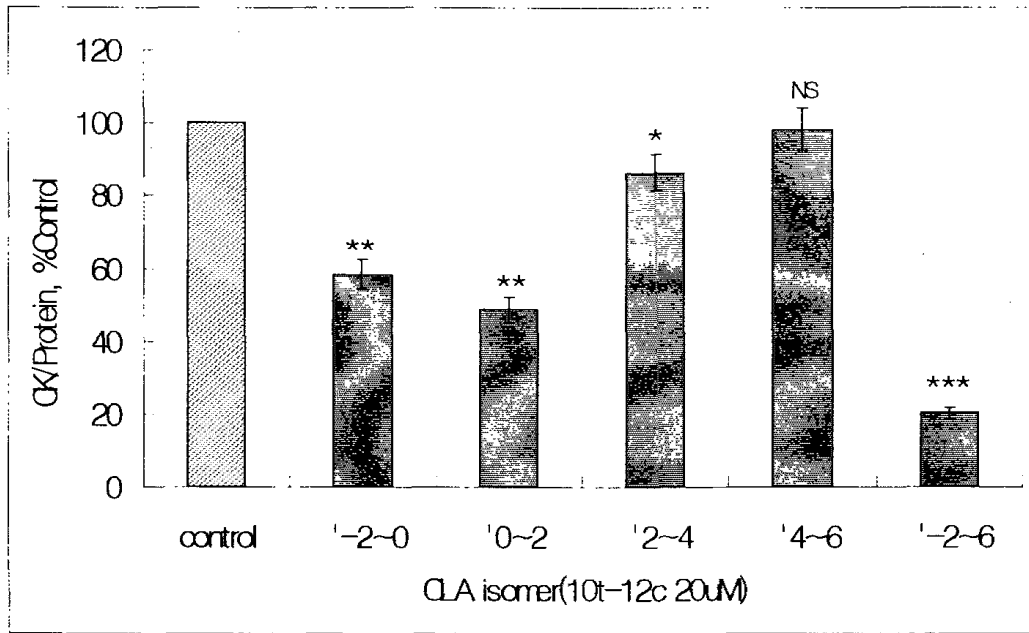


Figure 5. Effect of treatment interval of 10t-12c(20uM) on differentiation of L8 cells. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

4. CLA가 L8 cell의 DNA 함량 및 세포수에 미치는 영향

CLA가 근육세포의 분화억제를 가져온 작용기전 구명의 일환으로 CLA를 분화유도전 즉 day -2~0에 처리하고 난 뒤 DNA 양과 세포수에 미치는 영향이 Fig. 6과 7에 각각 나타나 있다. 뚜렷한 분화억제작용을 나타냈던 10t-12c와 10t-12c를 44% 함유한 CLAmix를 처리한 근육세포의 DNA 함량이 적었다(Fig. 6). 이 사실은 이들의 세포분화억제 작용의 일부가 DNA 합성억제 작용에 의해 매개된다는 것을 나타낸다. 세포수도 DNA 함량과 유사한 결과를 나타냈는데 세포수의 억제정도가 DNA 함량억제에 비해서는 그정도가 적었다(Fig. 7).

본 연구의 결과를 요약하면 지방전구세포(3T3-L1 cell)에서 세포분화를 억제한 10t-12c와 이를 44% 함유한 CLAmix는 근육세포의 분화도 억제했다. 특이한 것은 지방세포의 분화를 촉진한 9c-11c 이성체는 근육세포의 분화를 억제한 사실이다. 세포종류에 따라 이성체의 작용이 상반된 것에 대한 작용기전 구명이 이뤄져야 할 것이다.

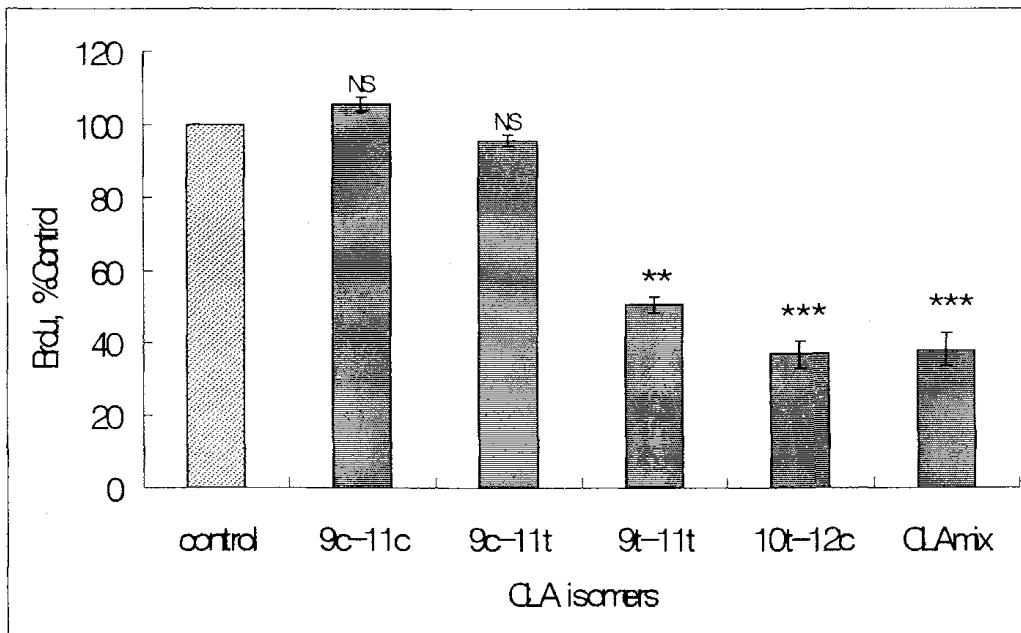


Figure 6. Effect of various CLA isomers on DNA content of L8 cells. Fifty μ M of each CLAs were treated for day -2~0. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(^{NS} : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

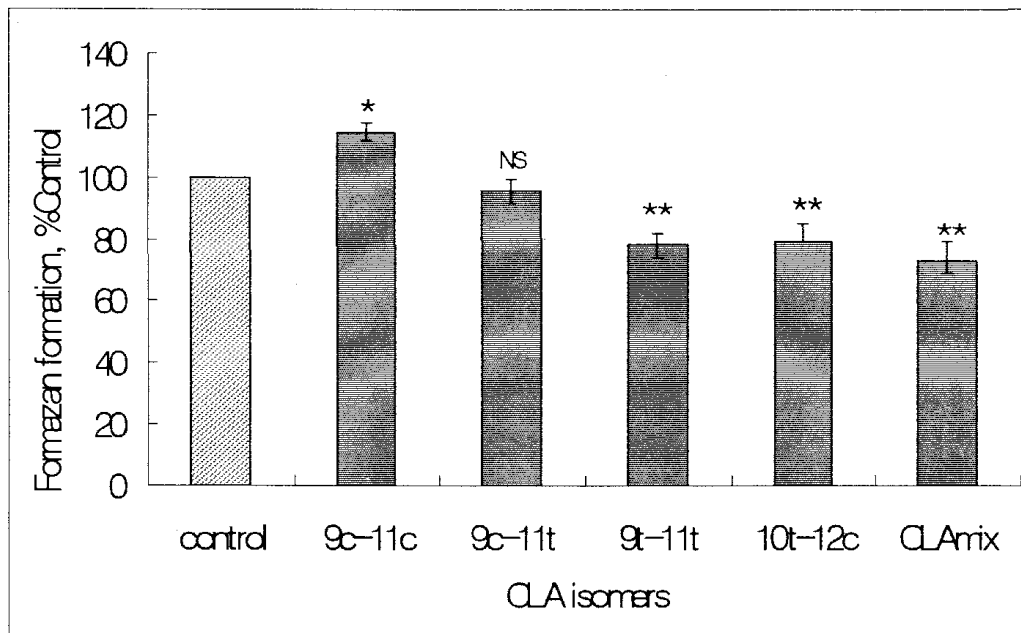


Figure 7. Effect of various CLA isomers on cell numbers of L8 cells. Fifty μ M of each CLAs were treated for day -2~0. Reported values are mean \pm S.E. (n = 8, collected from two independent experiments performed on four wells) ; difference from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated control cells.

(NS : not significant * : P < 0.05 ** : P < 0.01 *** : P < 0.001)

제 4장 CLA가 배양세포의 중성지방과 LPL activity에 미치는 영향

3T3-L1 cell을 이용해서 지방세포의 분화 억제작용을 나타낸 10t-12c와 CLAmix를 이용해서 3T3-L1과 돼지 primary fat cell의 중성지방(Tg)과 LPL activity에 미치는 영향을 조사했다. 본 연구의 결과는 10t-12c와 CLAmix를 돼지에게 사료의 형태로 급여할 때 지방축적억제를 가져올 가능성이 확인해 주는데 그 의미가 있다.

제 1절 재료 및 방법

1. 돼지 primary fat cell의 분리 및 배양

본 연구에 사용된 3T3-L1cell의 배양방법은 제 1장에서 상세히 설명했으므로 여기서는 생략하고 돼지 primary fat cell의 분리 및 배양방법에 대해 설명하겠다.

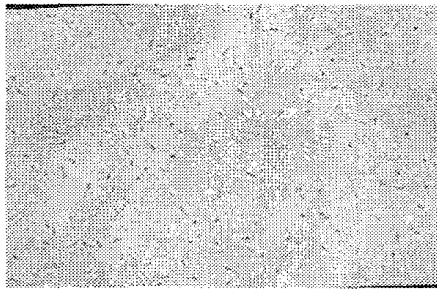
가. primary fat cell의 분리

생후 1-2일령된 체중 1.7-1.8kg 정도의 자돈을 desicator에서 CO₂ gas를 주입하여 질식사 시킨 후 비눗물로 몸 전체를 씻겼다. 이때 발굽, 항문 및 입주위를 중점적으로 세척하고 10% Iodine을 이용해서 다시 몸전체를 닦아냈다. 특히, 등부위를 중점적으로 세척하고 tray위에 돼지를 올려놓고 clean bench에서 scaple을 이용해 머리 밑에서 견갑골까지 I자 모양으로 자른 후 forcep과 blade로 지방조직을 취했다. 미리 무게를 측정한 petridish에 지방조직을 옮겨서 지방조직의 무게 당 2000unit collagenase와 3ml KRB buffer와 섞어 0.22um disk filter와 주사기로 filtering해서 curved scissors로 chopping했다. collagenase는 다른 효소들 보다 세포와 세포 사이를 분리하는 능력은 떨어지지만 1차 동물 세포배양에서는 상처를 가장 안주는 효소로 알려져 있기에 이 효소를 사용했다. 잘라진 지방조직을 삼

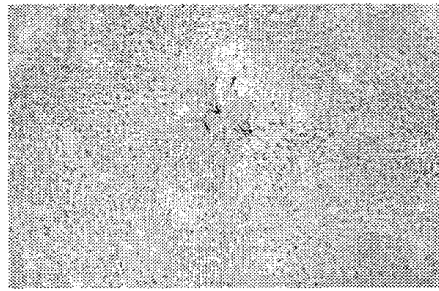
작플라스크에 옮긴 후 40분 동안 shaking water bath에서 high control shaking을 시켰다. 40분 후 250um nylon mess로 filtering해서 3000 RPM으로 10분 동안 centrifuge 시키고 KRB(Kreb's ringer bicarbonate) buffer로 disperse한 후 2000 RPM으로 10분 동안 centrifuge 시켰다. F-12 DMEM을 5ml 넣어 tube 바닥의 cell들을 disperse한 후 75um mess filter를 이용해서 새로운 50ml tube에 옮겼다. Tube안의 cell 20ul를 Hemacytometer를 이용해 counting 하고 6-well plate에 1×10^6 cells/well을 seeding했다. Seeding 에 사용된 media는 F-12/DMEM이었으며 10% FBS를 함유했다.

나. primary fat cell의 배양

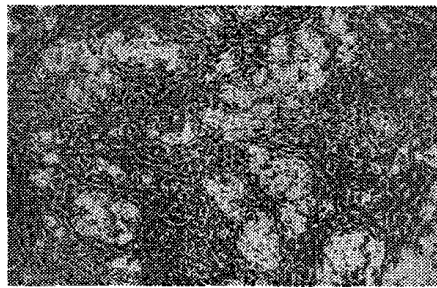
cell을 seeding 1일후에 FBS가 없는 F-12/DMEM으로 2회 wash해서 RBC 등을 제거했다. 그리고 5% FBS를 함유한 F-12/DMEM에 insulin(100ng/ml), transferrin(100ng/ml) 및 hydrocortisone(50ng/ml)(I.T.C)을 첨가해서 분화를 유도했다(day 0). 이때 부터 분화가 완료되는 날(대개 day 15)까지 2일마다 media를 교환했는데 이때도 I.T.C 및 5% FBS를 함유한 F-12/DMEM을 사용했다. 분화유도 15일후(day 15)에 Tg 함량과 LPL activity를 측정했다. Fig. 1은 분화유도(day 0)후 돼지 primary fat cell의 분화과정을 보여주고 있다.



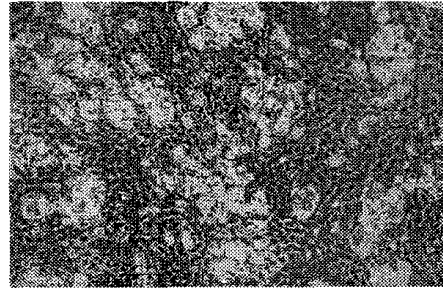
day 0



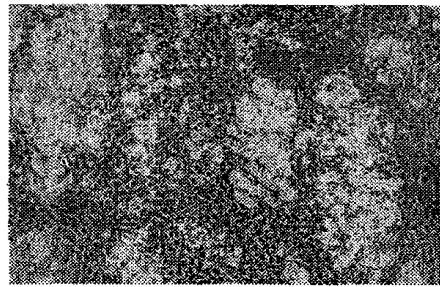
day 4



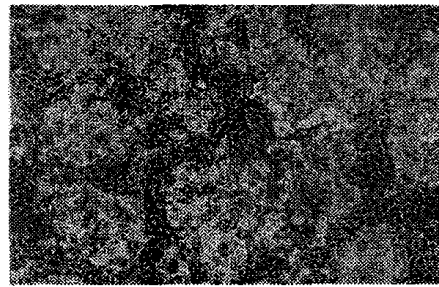
day 6



day 8



day 12



day 14

Figure 5. Differentiation of porcine primary preadipocytes. Day 0 indicates the day when preadipocytes were induced for differentiation.

2. 중성지방(Tg)의 측정

3T3-L1과 primary fat cell의 세포분화가 완료된 시기에 6-well plate의 배양액을 제거하고 PBS로 2회 cell을 wash했다. 다시 300ul의 PBS로 plate의 바닥에 있는 cell을 수집해서 sonication 시킨후 Sigma kit(Sigma Diagnostics 337-B)을 이용해서 cell의 total Tg 함량을 구했다.

3. lipoprotein lipase(LPL) activity 측정

중성지방(Tg)을 많이 함유한 lipoprotein인 chylomicron과 VLDL은 LPL에 의해 중성지방이 분해되어 chylomicron/VLDL remnant와 free fatty acid로 분해된다. LPL 활성측정은 지방산이 얼마나 생성되었는가를 조사하는데, 이때 기질로 ^3H 를 이용하여 효소활성을 측정했다. 본 연구에서는 돼지 지방전구세포가 성숙지방세포로 분화하면서 나타내는 LPL 활성도를 측정하는 것인데, 본 연구에서 사용한 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다. LPL 분석 하루 전에 효소 반응에 필요한 기질로 ^3H triolein, phosphatidyl choline, triolein을 섞어 기질을 제조했다. 질소 gas로 기질을 건조시키고 glycerol을 첨가한 뒤 sonication 시켜 밤새 실온해서 방치했다. 분석하기에 앞서, glass homogenizer에 300ul의 Eckel 첨가 buffer를 넣은 후 얼음 위에 쫓아 냉각시켰다. 50mg 정도의 지방조직을 glass homogenizer에 넣고 homogenize 시킨 후 sample은 cut tip을 사용해서 1.5ml microfuge tube로 옮겼다. 원심분리 시켜 homogenate만 취해 LPL tube에 옮기고 1:15 비율로 희석시킨 희석액(50 μl homogenate와 700 μl Eckel 부첨가 buffer)을 넣고 vortex했다. LPL glass tube에 150 μl 희석액과 150 μl WS(working substrate)를 넣고, blank에는 150 μl Eckel 무첨가 buffer와 150 μl WS를 넣었다. WS는 dH₂O, 체내와 같은 pH 조절을 위한 1M Tris pH 8.6, 체내와 같은 영양환경 조성을 위한 15% BSA, serum, 기질을 넣어 제조했다. WS는 serum을 넣은 것과 넣지 않은 no serum을 비교하는데 serum에는 LPL의 활성을 증가시키는 cofactor₂가 있어 serum의 차이로 LPL 활성 값이 결정된다. Blank 또한 serum과 no serum을 구별하여 tube를 37°C water bath에서 1시간동안 medium speed로 shaking시켰다. 지방추출과정 중 지방산 있는 층과 없는 층을 나누는 역할을 하는 3.25ml KILL solution을 넣고 vortex한 뒤 다시 1.05ml borate-carbonate

buffer를 첨가한 후 다시 vortex하고 centrifuge 시켰다. blank의 top phase로부터 0.5ml씩 3번 취해 test tube를 만들었다. 잘 섞은 후 tip을 적서 wet 상태로 만들어 sample에 pipetting 했다. 각 sample의 top phase로부터 0.5 ml를 취해 7ml scintillation vial에 넣고 여기에 scintillation fluid 4ml를 넣고 vortex했다. blank의 top phase로부터 0.5ml를 취해 7ml scintillation vial에 넣고 여기에 scintillation fluid 4ml를 넣고 vortex했다. 또 7ml scintillation vial에 10 μ l WS를 넣고 4ml scintillation fluid를 넣었다. 마지막으로 ³H의 activity를 β -counter기로 측정했다. LPL 활성은 (CPM - blk) \times K \times homogenized vol. \times 15/0.15를 지방조직의 무게 값으로 나누어 주었다. CPM은 sample(serum의 평균, no serum의 값), blk는 blank(serum/no serum)의 평균, K는 $3 \times 2.42 / 0.5 \times 1 / 0.55 \times 1 / \text{assay time} \times 1 / \text{SA}$ 로 구했다. assay time은 1로 waterbath에서 shaking한 1시간을 의미한다. SA는 (mean WS - mean blk) \times 15인데, mean WS는 WS(serum/no serum)의 평균을 의미하고 mean blk는 blank의 평균을 의미한다. homogenized vol. \times 15/0.15은 30인데, 이것은 homogenized vol.에 처음 과정에서 첨가한 300 μ l Eckel 첨가 buffer 값이다. 이 방법으로 각 sample의 LPL 값을 구한 뒤 serum에서 no serum을 빼준 값으로 최종 LPL 값을 구했다.

제 2절 결과 및 고찰

1. CLA가 배양된 세포의 Tg 함량에 미치는 영향

Fig. 2에서 보는대로, 3T3-L1 cell의 분화를 억제시킨 결과를 나타낸 10t-12c구와 이를 44% 함유한 CLAmix구는 대조구에 비해 triglyceride(Tg)함량이 적었는데, 이 사실은 이들 두 CLA처리 받은 cell의 분화가 적었거나 또는 세포내의 Tg 생성이 적었음을 말해준다. Yamasaki 등(1999)은 CLA를 함유한 사료를 급여받은 쥐의 지방세포의 Tg 함량의

감소를 관찰했는데 이것은 CLA급여 받은 쥐에 지방세포의 lipid filling이 적은 것이 그 원인이라고 보고했다.

Fig. 3은 CLA가 돼지의 primary fat cell Tg 함량에 미치는 영향을 나타낸 것인데 cell line인 3T3-L1 cell처럼 10t-12c구와 CLAmix 구의 Tg 함량이 적었다. 돼지 primary fat cell을 이용한 본 연구의 결과는 돼지에게 사료의 형태로 10t-12c와 CLAmix를 급여할 경우 돼지의 지방축적이 억제될 가능성을 나타내 주는 결과라고 볼 수 있다.

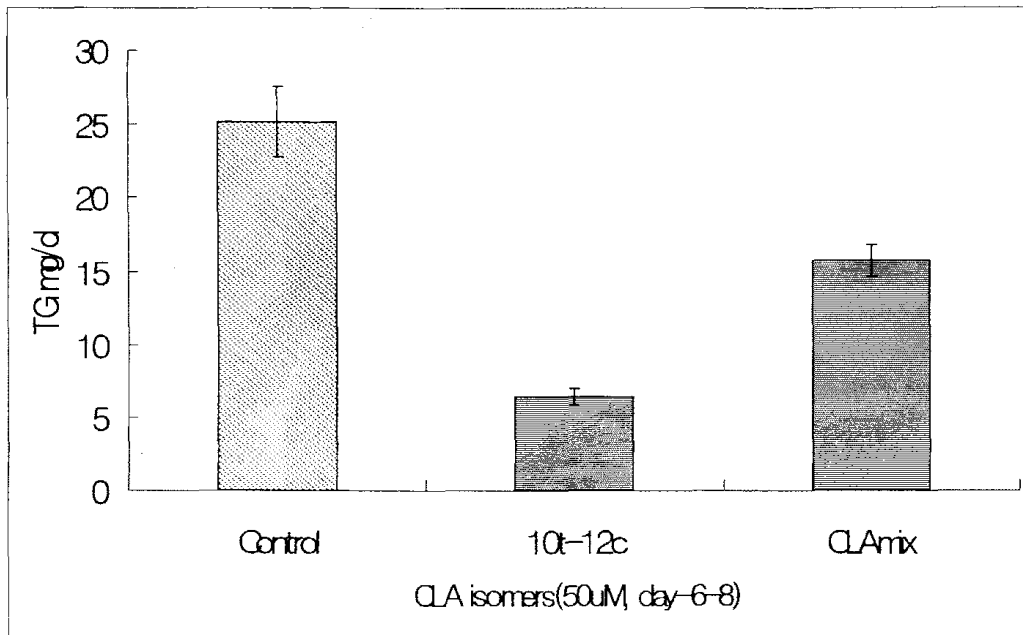


Figure 2. Effect of CLA isomers triglyceride content of 3T3-L1 cells.

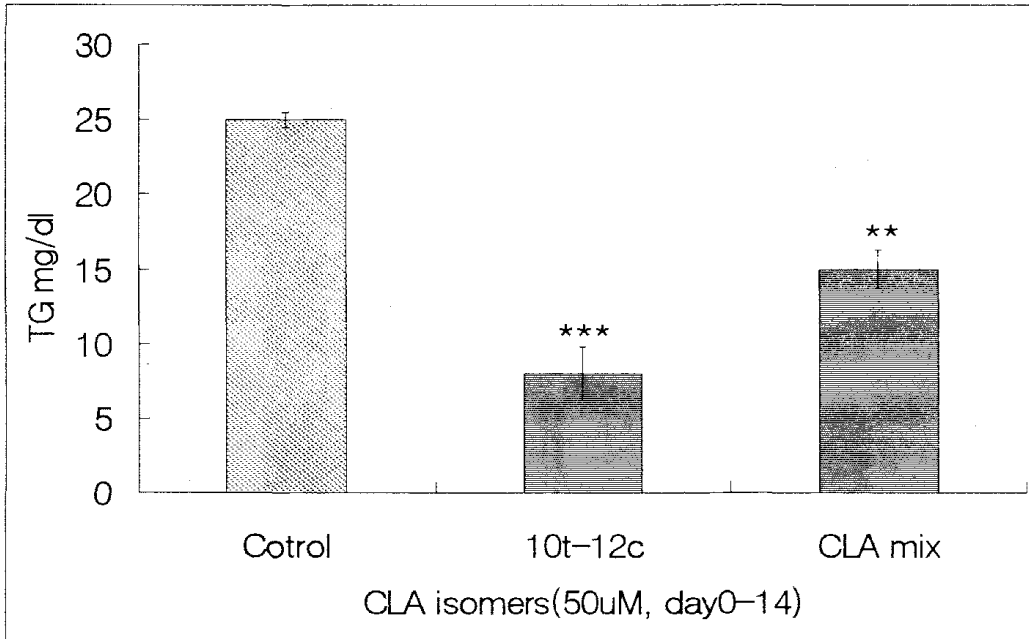


Figure 3. Effect of CLA isomers triglyceride content of porcine primary fat cell.

2. CLA가 배양된 세포의 LPL activity에 미치는 영향

10t-12c와 CLAmix를 20uM과 50uM 농도로 처리했을 때 3T3-L1 cell의 LPL activity에 미치는 영향이 Fig. 4에 나타나 있다. CLA 처리가 cell의 Tg 함량에 미치는 영향만큼 뚜렷하지 않지만 이들 두 CLA구의 LPL activity가 대조구에 비해 낮은 경향을 나타냈고 10t-12c의 LPL activity는 유의적으로 낮았다. 돼지 primary fat cell의 LPL activity가 Fig. 5에 나타나 있는데 10t-12c와 CLAmix 20uM과 50uM에서 모두 뚜렷하게 LPL activity를 감소시켰다. CLA를 처리받은 돼지 primary fat cell의 Tg 함량과 LPL activity가 감소한 것은 CLA를 돼지에게 사료의 형태로 공급했을 때 지방축적이 감소할 가능성을 보여줬다고 볼 수 있다.

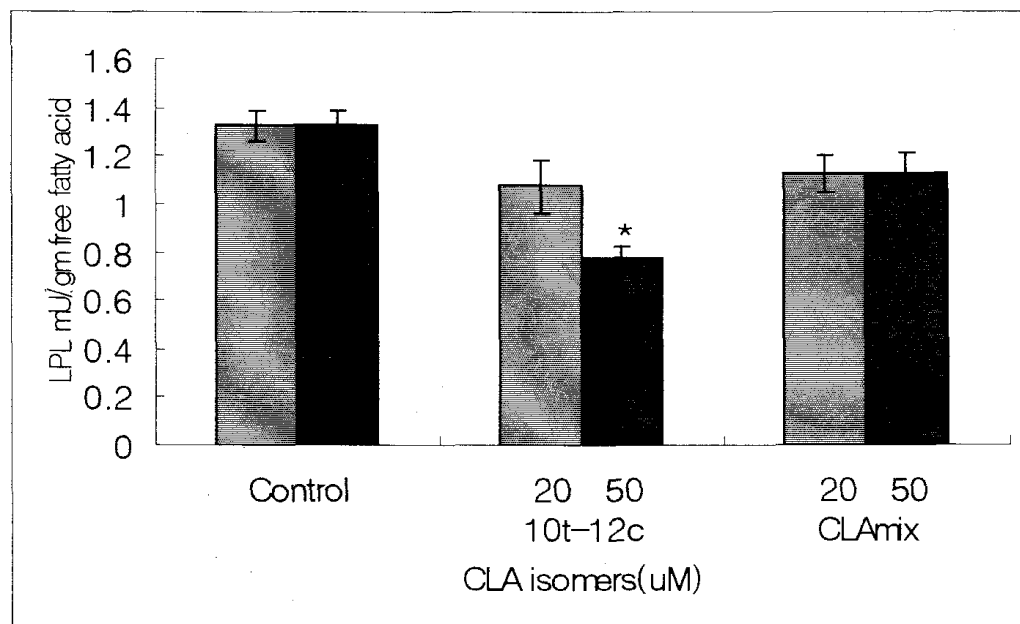


Fig. 4. Effect of CLA isomers on LPL activity of 3T3-L1 cell.

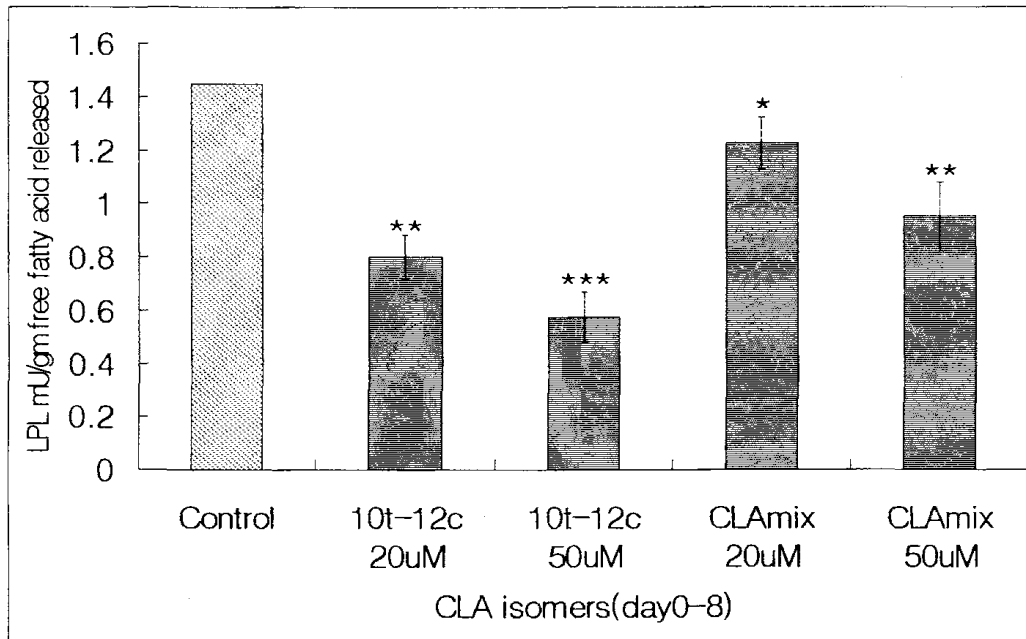


Figure 5. Effect of CLA isomers on LPL activity of porcine primary fat cell.

제 5장 CLA 급여가 돼지의 지방 축적에 미치는 영향

Cell line인 3T3-L1 cell을 이용해서 지방세포의 분화를 억제한 것으로 밝혀진(제 2장) 그리고 3T3-L1과 돼지 primary fat cell의 Tg 함량과 LPL activity를 감소시킨 것으로 확인된(제 3장) CLA 10t-12c와 CLAmix를 돼지에게 4주간 급여해서 과연 이들 CLA가 돼지의 지방축적 억제작용을 나타내는지를 구명하는 것이 본 연구의 주목적이다. 본 연구의 결과가 이들 CLA가 돼지의 지방축적을 억제하는 것으로 판명될 경우 장기간 돼지에게 사양실험을 수행하는 대신에 단기간 세포배양 실험 결과에 의해 CLA의 지방축적 억제 작용을 판정할 수 있을 것이다. 본 연구에서 CLAmix의 작용을 함께 조사하는 이유는 실제로 CLA가 돼지의 지방축적 억제제로 사용될 경우 값싼 CLA의 공급원이 될 수 있기 때문이다.

제 1절 재료 및 방법

1. 사료배합에 이용된 CLA의 공급원

91%의 순도를 가진 10t-12c와 43%의 10t-12c와 45% 9c-11t를 함유한 CLA mixture(CLAmix)는 경남 진주소재 H&K biotek 회사에서 제조한 것이었는데, 91% 순도를 가진 10t-12c를 급여한 실험은 본 연구가 세계 최초일 것이다. 세포배양실험에 사용된 CLAmix는 10t-12c를 44% 함유했는데, 본 사양실험에 사용된 CLAmix는 10t-12c를 43% 함유하고 있어서 세포배양의 결과를 사양실험에 적용해도 무리가 없을 것이라고 여겨진다.

2. 시험구 및 공시가축

대조구는 14%의 단백질을 함유한 corn-soy diet구였고, 이 대조구사료에 무게비로 0.5%의 10t-12c를 함유한 사료를 급여한 10t-12c구 그리고 0.5%의 CLAmix를 함유한 사료를 급여한 CLAmix구 등 총 3 처리구였으

며, 각 처리구에 기세한 수태지 5마리씩 배치해서 총 15마리를 방사했다. 방사돼지의 개시체중은 평균 80.9kg이었다.

3. 시험사료 배합 및 급여

국내에서 구입한 사료배합용 CLA는 -70℃에 보관했다가 배합당일 녹여서 기초사료(대조구사료)와 배합해서 서늘한 곳에 두었는데 저장기간은 1주일이었다. 대조구 사료는 Table 1에 나타난 대로 corn-soy diet로 단백질 14%, lysine 0.65% 및 대사 에너지 3,271kcal/kg을 함유했고, 지방함량은 3.33%이었는데 에너지원으로 동물성지방을 사용하면 첨가한 CLA가 돼지 체내의 대사작용에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 tallow 등 동물성 지방은 첨가하지 않았다. 10t-12c구와 CLAmix구는 대조구 사료에 무게비로 0.5% 10t-12c와 CLAmix를 섞은 사료를 4주동안 급여했다. 1일 사료 급여량은 3처리구 모두 마리당 3.15kg이었으며, 같은 처리구에 속한 돼지 5마리를 한칸에 넣어 사육했다.

Table 1. Formula and nutrient content of experimental diet

| Ingredients | % |
|---------------------------------|--------|
| Corn | 81.41 |
| Soybean meal | 16.35 |
| Salt | 0.3 |
| Tricalcium phosphate | 1.96 |
| Mineral premix | 0.2 |
| Vitamin premix | 0.05 |
| Total | 100.00 |
| Calculated nutrient composition | |
| ME(kcal/kg) | 3,271 |
| C. protein(%) | 14.00 |
| C. fat(%) | 3.33 |
| Lysine(%) | 0.65 |
| Calcium(%) | 0.70 |
| Total phosphorus(%) | 0.66 |

4. 조사항목

증체량과 사료섭취량은 2주마다 조사했고 등지방 무게는 초유파 측정기를 이용해서 7번과 8번 늑골부위를 실험 종료시에 측정했다. 지방조직의 지방산 함량은 종료시에 첫 번째 늑골 부위에서 biopsy한 지방조직을 이용해서 측정했다. 지방조직의 지방합성량(lipogenesis)과 지방합성과 관련효소(lipogenic enzyme) 및 지방분해는 종료시에 biopsy한 등지방 조직을 이용해서 측정했다. 혈중 cholesterol 함량은 0, 2 및 4주에 경정맥으로부터 채취한 혈액을 이용해서 측정했다.

5. 돼지 지방조직의 지방산 분석

약 0.2g의 지방조직을 채취하여 50ml tube 넣고 internal standard(C12:0) 0.1ml을 넣었다. 여기에 Folch solution을 넣고 잘 흔들어 지방이 추출하게 하였다. 일정한 시간 경과후 여기에 0.88%의 NaCl 용액

을 넣어서 chloroform과 결합한 지방층과 물과 methanol은 상층으로 분리되게 하였다. 원심분리에 의해 분리된 지방이 함유된 chloroform을 65℃의 hotplate에 놓고 N-gas하에 증발시켰다. 그리고 ICl : Methanol=1 : 2 용액을 넣고 뚜껑을 막고 waterbath에 100℃의 물에 60분 가량 증탕시켰다. 증탕시킨 후에 hexane을 넣고 잘 흔들어 준 다음 한시간 가량 놓아두게 되면 상층에 hexane에 녹아든 지방을 vial에 옮겼다. 모든 시료를 vial에 넣은 후 여러 지방산의 함량을 알고 있는 external standard와 함께 GC로 분석하였다. 분석 후 각 시료의 peak를 external standard의 peak와 비교 식별하여 면적(%)을 계산하여 각각 시료의 지방산 조성을 계산하였다.

6. 돼지 지방조직 절편의 지방합성량 측정

지방조직의 지방합성량은 지방조직절편을 5mM glucose와 ^{14}C -glucose이 들어있는 KRB buffer에서 incubation하는 중 glucose가 지방으로 전환된 양으로 측정했는데 구체적인 방법을 설명하면 다음과 같다.

가. Incubation buffer 제조

지방합성을 측정하기 위한 KRB buffer 조성은 0.118M NaCl, 4.77mM KCl, 1.256mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.232mM KH_2PO_4 , 1.232mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 24.79mM NaHCO_3 였는데 여기에 25mM HEPES, 5mM glucose와 3% ovine serum albumin을 넣고 gas(95% O_2 + 5% CO_2)를 첨가하고 난 뒤 pH=7.4로 조절했다. Incubation tube는 유리로 만들어진 20ml scintillation vial을 사용했고 여기에 3ml의 KRB buffer를 넣었는데 이 3ml 속에 위의 배양액과 같은 농도의 호르몬을 함유하게 했으며 각 vial 마다 0.5uCi의 C^{14} -glucose를 포함시켰다.

나. 등지방조직의 biopsy와 지방합성 측정

지방합성 및 지방합성에 관여하는 여러 효소들의 activity 측정을 위해 서 한 마리로부터 상당량의 등지방을 biopsy해야 했기 때문에, stress를 최소화하기 위해서 Janssen사(Belgium) 제품인 Stresnil로 약하게 마취를 하고 난 뒤에 지방조직이 두꺼운 부위인 제 1늑골 부근의 등지방조직을 biopsy 했다. Biopsy한 지방조직은 DMEM이 든 vinyl bag에서 잠시 보관

했다가 microtome을 이용해서 약 15mg 크기로 자르고 위에서 설명한 incubation vial에 넣고 shaking waterbath에서 2시간동안 incubation 시켰고, vial을 가루얼유에 꽃아서 incubation을 중단시켰다.

다. 지방추출 및 지방합성량 계산

무게측정이 끝난 후 지방조직절편을 5ml의 Dole's solution(Dole, 1965, 부피로 isopropanol: 40, n-heptane: 10, 1N H₂SO₄: 1)이 든 vial에 넣은 후 ultrasonic waterbath에서 30분간 지방추출했다. 이 vial에 3ml의 hexane과 3ml의 H₂O를 넣은 후 지방이 포함된 상층유기용매를 scintillation vial에 넣고 추가로 1.5ml의 hexane으로 행구었다. 유기용매를 dry-bath에서 증발시키고 난 뒤 5ml의 scintillation cocktail을 넣고 liquid scintillation counter로 C¹⁴-lipid의 activity를 측정했다. 지방합성은 포도당이 지방으로 전환된 양으로 측정했는데 KRB buffer에 함유된 labelling 되지 않은 포도당(5mM, 3ml에는 15umole)에, incubation vial에 포함된 총 C¹⁴ activity 중 추출된 지방중에 포함된 것의 비율을 곱해서 구했다.

7. 지방조직의 지방합성 관련 효소의 activity 측정

Biopsy한 돼지 등지방조직을 급속동결해서 -75℃에 분석전까지 보관했다. 동결된 지방조직은 이 무게의 2.5부피 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 homogenize한 다음 3,000×g에서 15분간 원심 분리해서 상층액을 또 다른 tube에 넣은 다음 다시 15,000×g에서 30분간 원심분리하고 난 뒤 상층액을 이용해서 효소의 활성을 측정했다. NADP-malate dehydrogenase(ME)는 Ochoa(1995)의 방법에 의해서 그리고 fatty acid synthase(FAS)는 Magri 등(1990)의 방법에 의해서 측정했다.

8. 지방분해(lipolysis)의 측정

CLA사양 실험이 끝난 후 biopsy한 지방조직 절편을 약 50mg 크기로 잘라서 KRB 용액에서 2시간 incubation 시킨 후 지방조직의 무게를 측정하고 난 뒤 KRB 용액을 -70℃에 얼려 뒀다가 일본 Wako사의 kit(Code no.

994-75409E)을 이용해서 용액의 유리지방산을 측정함으로써 구명했다.

9. 혈중 cholesterol 함량 측정

혈중 HDL-cholesterol 및 total cholesterol 함량은 Arkary사 제품 kit를 이용해서 SPOTCHEM™ SP-4410으로 분석하였다.

제 2절 결과 및 고찰

1. 돼지의 성장생산성

Table 2에서 보는 대로 CLA 급여가 돼지의 증체량을 증가시킨 경향을 나타냈고, 이에 따라 사료효율도 CLA 급여구에서 향상되는 경향을 나타내었다. 등지방 두께는 CLA 급여구가 대조구에 비해 약간 높았는데 이것은 세포배양 실험에 의해 CLA가 지방세포의 분화억제를 나타낸 것과는 상반되는 결과이다. Thiel-Copper 등(2001)은 26.3kg의 돼지에게 0.5% CLA를 포함해서 1.0%까지 CLA를 함유한 사료를 급여한 결과 일당증체량이 CLA 함유량에 비례해서 증가했다고 보고했다. 한편 Dugan 등(1997)은 sunflower oil을 급여한 돼지와 CLA를 급여한 돼지간에 일당증체량의 차이가 없었다고 보고했다. 더욱이 Cook 등(1998)은 49일동안 돼지에게 CLA를 급여한 결과 대조구에 비해 일당증체량이 감소했다고 보고했다. 일당증체량에 대한 CLA의 효과가 연구자에 따라 다른 이유는 설명하기 어려운데, 돼지의 연령, CLA의 순도와 급여수준 및 돼지의 품종 등이 달랐기 때문으로 사료된다. 결론적으로 CLA가 돼지의 일당증체량에 미치는 영향은 뚜렷하지 않음을 알 수 있다. 사료효율(gain/feed)에 있어서는 Thiel-Copper 등(2001)은 CLA 급여에 의해서 향상되었음을 나타내었는데 대조구가 0.352, CLA 0.5%구가 0.370, CLA 1%구가 0.384로 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 2. Effect of dietary CLA on growth performance of finishing pigs

| Items | Control | 10t-12c | CLAmix |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Intial body wt.(kg) | 81.0±0.42 | 81.1±0.58 | 80.8±1.15 |
| Final body wt.(kg) | 107.9±2.79 | 110.3±1.71 | 111.7±2.41 |
| Average daily gain(kg) | 0.96±0.091 ^A | 1.04±0.06 ^A | 1.10±0.064 ^A |
| Daily feed intake(kg) | 3.15 | 3.15 | 3.15 |
| feed/gain | 0.31 | 0.33 | 0.35 |
| Ultrasound backfat(cm) | 1.33±0.100 ^B | 1.39±0.121 ^{AB} | 1.46±0.111 ^A |

2. 지방조직의 지방산 조성

제 1늑골 부근의 지방조직을 이용해서 측정한 지방산(fatty acid) 조성이 Table 3에 나타나 있는데 10t-12c구는 대조구에 비해 지방산 조성중 10t-12c 뿐만아니라 9c-11t의 농도도 높았다. 그리고 CLAmix구도 비슷한 결과를 나타냈는데, 지방산중 10t-12c의 농도는 10t-12c 급여구보다 낮았다 (0.49% vs 0.39%). 대조구 지방조직의 10t-12c함량은 detect할 수 없을 정도로 낮았으나 9c-11t 함량은 상당한 수준을 나타냈다(0.32%). 이 사실은 돼지 체내에서 10t-12c는 다른 지방산에서 만들어지기 어려우나 9c-11t는 만들어 질 수 있음을 나타낸다. 위의 결과로 미루어봐서 10t-12c구의 지방산 중 10t-12c 대부분이 사료로 공급된 10t-12c로부터 왔음을 알 수 있다. 본 연구의 결과를 뒷받침하는 증거로 Cook 등(1998)과 Kramer 등(1998)은 급여한 CLA 수준에 비례해서 지방산중 CLA 함량이 증가했다고 보고했다. 위의 사실들은 인체의 건강증진을 염두에 둘 때 사료 CLA에 의해 CLA 함량이 높은 돼지고기 생산은 크게 별로 어렵지 않음을 나타낸다. CLA 급여는 지방조직의 C_{14:0}과 C_{16:0} 함량을 감소시켰는데(Table 3), 이것에 대한 이유는 CLA가 desaturase의 작용을 억제했기 때문으로 여겨진다. Lee 등(1998)은 CLA 급여가 간의 desaturase의 작용을 감소시켰다고 보고했다.

Table 3. Effect of dietary CLA on fatty acid composition of pig adipose tissue

| | control | 10t-12c | CLAmix |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| C14:0 | 10.94 ± 0.029 ^A | 1.74 ± 0.177 ^A | 1.55 ± 0.022 ^A |
| C14:1 | 0.04 ± 0.033 ^A | 0.03 ± 0.018 ^A | 0 0 |
| C15:0 | 0.08 ± 0.005 ^A | 0.08 ± 0.010 ^A | 0.05 ± 0.023 ^A |
| C16:0 | 15.73 ± 0.278 ^B | 17.88 ± 0.491 ^A | 17.67 ± 0.331 ^A |
| C16:1 | 2.57 ± 0.139 ^B | 3.18 ± 0.270 ^A | 3.37 ± 0.142 ^A |
| C17:0 | 0.45 ± 0.039 ^A | 0.49 ± 0.073 ^A | 0.45 ± 0.059 ^A |
| C17:1 | 0.44 ± 0.057 ^A | 0.48 ± 0.060 ^A | 0.41 ± 0.049 ^A |
| C18:0 | 13.25 ± 0.531 ^A | 13.49 ± 0.900 ^A | 11.81 ± 0.486 ^A |
| C18:1 | 46.91 ± 0.453 ^A | 42.02 ± 0.581 ^C | 44.43 ± 0.578 ^B |
| C18:2 | 15.72 ± 0.391 ^A | 16.62 ± 0.262 ^A | 16.49 ± 0.443 ^A |
| C18:3 | 0.85 ± 0.042 ^A | 0.77 ± 0.039 ^A | 0.75 ± 0.049 ^A |
| c9t11 CLA | 0.32 ± 0.030 ^B | 0.91 ± 0.065 ^A | 0.94 ± 0.044 ^A |
| t10c12 CLA | ND* | 0.49 ± 0.067 ^A | 0.39 ± 0.047 ^A |
| total CLA | 0.32 ± 0.030 ^B | 1.32 ± 0.094 ^A | 1.32 ± 0.058 ^A |
| C20:1 | 1.02 ± 0.078 ^B | 0.74 ± 0.050 ^A | 0.74 ± 0.027 ^A |
| others | 1.53 ± 0.116 ^A | 1.14 ± 0.095 ^{AB} | 0.97 ± 0.201 ^B |

※ ND = not detected

3. 지방조직의 지방합성 및 lipogenic enzyme activity

4주간의 CLA 급여후 돼지에서 biopsy한 등지방 조직을 이용해서 지방 합성량을 조사했는데 Fig. 1에서 보는 대로 CLA 급여구와 대조구간에 지방합성은 별 차이가 없었다. Table 4에는 malic enzyme(ME)와 fatty acid

synthase(FAS)의 activity가 나타나 있는데 CLA 급여구가 대조구에 비해 이들 두 효소의 activity가 높았다. 이 결과와 지방합성 결과는 10t-12c와 CLAmix를 급여해도 돼지의 지방축적 억제를 가져오기에 어려울 것을 암시하고 있는데 앞에서 설명한대로 CLA 급여구의 등지방 두께가 오히려 약간 두꺼웠다. Thiel-Cooper등(2001)도 CLA를 1%까지 급여한 결과 돼지의 10번째 늑골 부근의 등지방 두께는 감소했으나 다른 부위의 등지방두께(첫번째 늑골, 마지막 늑골 및 마지막 요추)는 감소하지 않았다고 보고했다. 한편 Cook 등(1998)은 CLA 급여가 돼지의 초음파 등지방두께를 26% 감소시켰다고 보고했고 Ostrowska 등(1999)은 체중 57kg의 돼지에게 8주간 CLA를 급여한 결과 도체의 지방함량이 CLA 급여수준에 비례해서 감소했다고 보고했다. CLA를 처리했을 때 지방세포의 분화는 억제되었지만 CLA를 급여받은 돼지의 지방축적이 억제되지 않는 이유는 1) in vivo의 경우 CLA이외의 다른 물질이 복합적으로 작용해서 CLA의 작용이 명확하지 못했거나 2) CLA가 돼지 체내에서 다른 물질로 대사 되어서 돼지 지방세포들이 충분한 CLA를 접할 수 없었거나 3)본 연구에 이용된 돼지의 체중이 너무 커서(개시체중 81kg) 지방세포의 수의 증가(hyperplasia)가 왕성히 일어나는 시기가 이미 지나서 CLA의 세포분화 억제작용이 두드러지지 않았기 때문으로 여겨진다. 앞으로 CLA 급여시기에 대한 연구가 수행되어 할 것으로 사료된다.

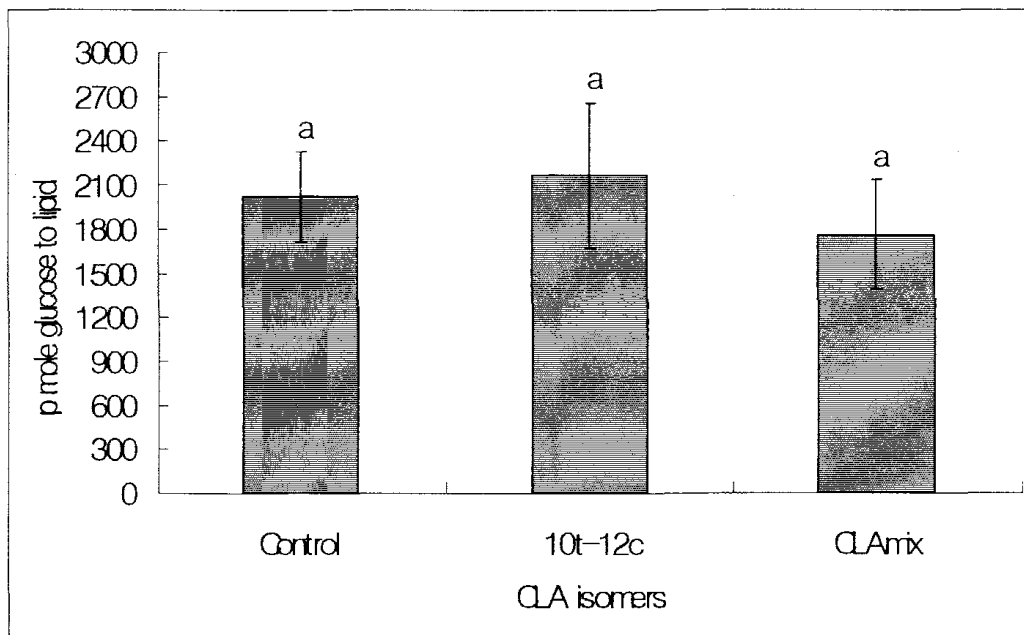


Figure 1. Effect of dietary CLA on lipogenesis on pig adipose tissue. Lipogenesis was expressed as p mole glucose conversion to total lipid.

Table 4. Effects of dietary CLA on lipogenic enzymes of pig adipose tissue

| | Control | 10t-12c | CLAmix |
|---|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| NADP-malate dehydrogenase ¹⁾ | 1,517.8 ± 89.71 ^A | 2,166.8 ± 225.50 ^B | 1,554.5 ± 52.16 ^A |
| Fatty acid synthase ¹⁾ | 88.9 ± 19.18 ^B | 150.5 ± 34.30 ^A | 144.8 ± 11.74 ^A |

¹⁾ unit, p mol/ min/ g adipose tissue

4. 지방조직의 지방분해(lipolysis)

CLA가 지방분해에 미치는 영향은 CLA 급여 종료 후에 biopsy한 지방 조직을 항온수조에서 배양중에 release한 유리 지방산의 양으로 측정했는

데 Fig. 2에서 보듯대로 CLA 급여구가 대조구에 비해 지방분해가 약간 높은 경향을 보였으나 유의차는 없었다. 돼지의 지방축적(lipid deposition)은 지방합성(lipogenesis)과 지방분해(lipolysis)의 복합적인 결과이고 이것이 동지방두께에 반영되는데, 본 연구의 결과 CLA는 지방조직의 지방합성과 지방분해에 미치는 영향이 미미했고 그 결과 동지방두께에 미치는 CLA의 작용도 뚜렷하지 않았다. 한가지 아쉬운 것은 지방분해 결과의 오차가 컸던 점인데, 이것은 처리내의 반복두수가 적었던 집(처리당 5마리) 그리고 동지방을 biopsy 할 때의 스트레스가 고르지 못했던 점등이 그 원인이라고 여겨진다.

5. 혈중 cholesterol 함량

CLA의 동맥경화 억제 효과가 여러 연구에 의해 확인되었기에(Lee 등, 1994), CLA를 급여받은 돼지 혈액의 Total-cholesterol과 HDL-cholesterol의 함량을 0주(CLA 급여직전), 2주, 및 4주에 측정했는데 그 결과가 Table 5에 나타나 있다. HDL-cholesterol은 3 처리간에 큰 차이가 없으나 HDL-cholesterol과 Total-cholesterol의 비율은 0주에는 대조구와 CLA 급여구간에 차이가 없었는데 4주간 CLA를 급여하고 난뒤에는 CLA 급여구가 대조구에 비해서 높았다($P < 0.05$). 이 사실은 CLA 급여가 동맥경화 억제에 기여할 수 있을 것임을 나타낸다. Nicolosi 등(1997)은 CLA를 급여받은 햄스터의 동맥경화가 감소했음을 보고했다.

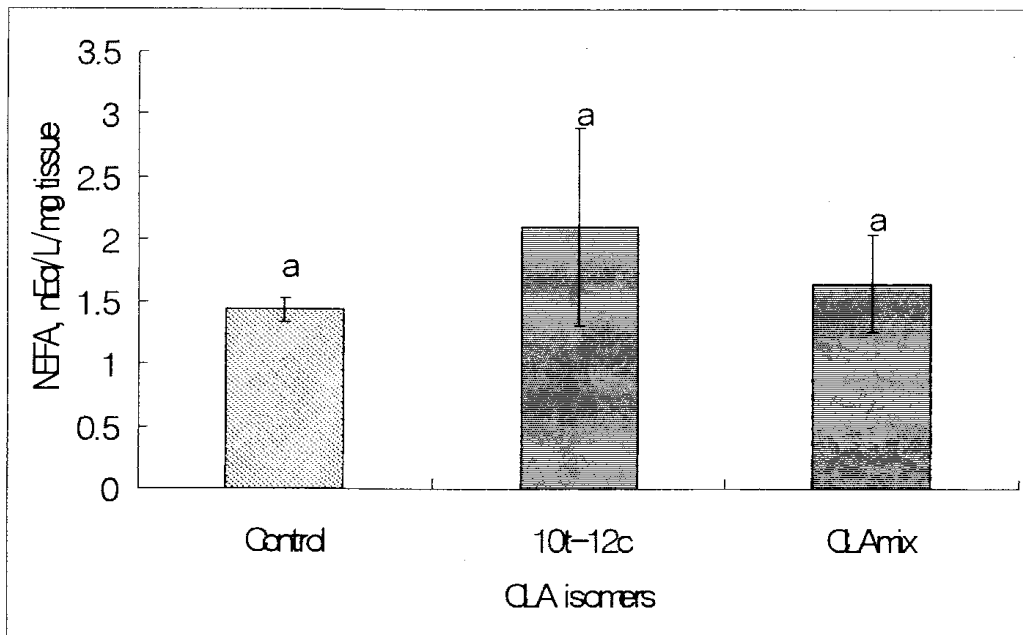


Figure 2. Effect of dietary CLA on lipolysis of pig adipose tissue
CLAs were fed for 4 weeks before biopsy of adipose tissue was taken.

Table 5. Effect of dietary CLA on blood cholesterol concentration

| | control | 10t-12c | CLA mix |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| week 0 | | | |
| total-ch | 84.75 ± 5.27 ^A | 84.8 ± 3.61 ^A | 95.4 ± 5.55 ^B |
| HDL-ch | 25.25 ± 3.61 ^A | 27.2 ± 2.29 ^A | 29.4 ± 3.39 ^A |
| HDL-ch/total-ch | 0.30 ± 0.03 ^A | 0.33 ± 0.04 ^A | 0.31 ± 0.03 ^A |
| week 2 | | | |
| total-ch | 95.5 ± 4.37 ^B | 80 ± 2.01 ^C | 103 ± 2.41 ^A |
| HDL-ch | 32.75 ± 4.05 ^A | 31.4 ± 2.55 ^A | 34 ± 1.74 ^A |
| HDL-ch/total-ch | 0.27 ± 0.03 ^B | 0.39 ± 0.03 ^A | 0.32 ± 0.01 ^{A^B} |
| week 4 | | | |
| total-ch | 84.5 ± 4.43 ^C | 91.6 ± 3.69 ^B | 100.2 ± 3.78 ^A |
| HDL-ch | 29.75 ± 5.60 ^B | 33.8 ± 2.91 ^{A^B} | 35.2 ± 1.60 ^A |
| HDL-ch/total-ch | 0.28 ± 0.06 ^B | 0.37 ± 0.03 ^A | 0.35 ± 0.01 ^A |

제 6장 결 론

In vitro 지방세포 배양실험에서 세포분화를 억제했던 CLA 이성체가 돼지 사양실험에서는 지방축적을 억제하지 않았다는 것이 본 연구의 핵심적인 결과이다. CLA가 지방세포의 분화에 미치는 영향이 돼지 사양실험 결과에 반영되지 않아서 본래 연구의 주목적이던 신속, 정확한 CLA의 역가판정방법을 확립할 수 없었다. 그러나 본 연구수행과정에서 확립한 실험 테크닉 즉 CLA가 3T3-L1 cell과 돼지 primary fat cell의 분화에 미치는 작용 측정방법은 CLA 제조회사의 생산 lot별 CLA의 역가판정에는 충분히 이용될 수 있을 것이다. 아울러 다른 연구자에 의해 확인된 10t-12c의 지방세포분화 억제작용을 재확인했고, 최초로 9c-11c는 지방세포의 분화를 촉진함을 밝혀낸 것은 본 연구의 또 하나의 수확이다. 본 연구에서 아쉬웠던 점은 돼지 사양실험용 CLA가 고가이어서 처리내에 반복수가 적었다는 점이다. 앞으로 돼지의 성장시기에 따른 CLA의 작용과 CLA의 작용기전 구명이 수행되었으면 한다.

제 7장 참고 문헌

- Abu-Ghazaleh, A.A., Schinoethe, D.J., Hippen, A.R., Whitlock, L.A. 2002. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid(CLA) content of milk. *J. Dairy Sci.* 85:624-631.
- Akahoshi, A., Goto, Y., Murao, K., Miyazaki, T., Yamasak, M., Nonaka, M., Yamada, K., Sugano, M. 2002. Conjugated linoleic acid reduces body fat and cytokine levels of mice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 66:916-920.
- An, B.K., Kang, C.W., Izumi, Y., Kobayash, Y. 2003. Effects of dietary fat sources on occurrences of conjugated linoleic acid and trans fatty acids in rumen contents. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 16(2):222-226.
- Banni S. 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. [review] *Current Opinions Lipidology* 13(3):261-266.
- Banni. S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E, Scanu, P., et al. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J. Lipid Res.* 42:1056-1061.
- Baumgard, L.H., Matitashvili, E., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Bauman, D.E., 2002. trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decrease lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(9):2155-2163.
- Belury, M.A., Kempa-Steczko, A. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 32:199-204.

- Belury, M.A., Vanden Heuvel J.P. 1997. Protection against cancer and heart disease by CLA:potential mechanisms of action. Nutr. Dis. Update 1:58-63
- Black, I.L., Roche, H.M., Gibney, M.J. 2002. Chronic but not acute treatment with conjugated linoleic acid(CLA) isomers(trans-10, cis-12 CLA and cis-9, trans-11 CLA) affects lipid metabolism in Caco-2 cells. J. Nutr. 132(8):2167-2173.
- Blankson, H., Stakkestad, J., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J., and Gudmundsen, O. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. J. Nutr. 130:2943-2948.
- Bergmeyer, H.V., and Gawehn(Ed.), K. 1974. Methods of Enzyme Analysis. Acaemic press. New York. 473-474.
- Bolte M.R., Hess B.W., Means W.J., Moss G.E., Rule D.C. 2002. Feeding lambs high-oleate or high-linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. J. Anim. Sci. 80:609-616.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254.
- Brodie, A.E., Manning, V.A., Ferguson, K.R., Jewell, D.E. and Hu, C.Y. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. J. Nutr. 129 : 602-606.
- Brown, M., Evans, M., McIntosh, M. 2001. Linoleic acid partially

restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 12:381-387.

Carta, G., Angioni, E., Melis, M.P., and Banni, S. Spada S. 2002. Modulation of lipid metabolism and vitamin A by conjugated linoleic acid. *Prostaglandin, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 67(2-3):187-191.

Chajes V, Lavillonniere F, Ferrari P, Jourdan M.L., Pinault M, Maillard V, Sebedio J.L., Bougnoux P. 2002. Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue is not associated with the relative risk of breast cancer in a population of French patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention.* 11(7):672-673.

Chen, C., Brodie, A.E., and Hu, C.Y. 1997. CCAAT/enhancer-binding protein β cannot overcome TCDD inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Obesity Res.* 5:146-152.

Chen Chien-An, Chen, Lu Wei, and Sih Charles J. 1999. Synthesis of 9c, 11t-Octadecadienoic and 10t, 12c-Octadecadienoic acids, the major components of conjugated linoleic acid. *Lipids.* 34:879-884.

Choi Y, Park Y, Storkson J.M., Pariza M.W., Ntambi J.M. 2002. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase activity by the cis-9, trans-11 isomer and the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(4):785-790.

Coakley M, Ross R.P., Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived

Bifidobacterium species. J. Appl. Microbiol. 94(1):138-145.

Cook, M.E., Jerome, D.L., Crenshaw, T.D., Burgr, D.R., Pariza, M.W., Albright, K.J., Schmidt, S.P., Scimeca, J.A., Lofgren, P.A. and Hentges, E.J. 1998. Feeding conjugated linoleic acid improves feed efficiency and reduces carcass fat in pigs FASEB J. 11:3347.

Cook, M.R., Miller, C.C., Park, Y. and Pariza, M. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism-nutritional control of immune-induced growth depression. Poult. Sci. 72:1301-1305.

Dani, C., Amri, E.Z., Bertrand, B., Enerback, S., Bjursell, G., Grimaldi, P. and Alihaud, G.. 1990. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. J. Cell. Biochem. 43:103-110.

Dchoa, S.. 1955. Malic enzyme. Methods Enzymol. 1:735.

Dugan, M.E.R., Aalus, J.L., Schaefer, A.L, and Kramer, J.K.G. 1997. The effects of linoleic and on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. Can. J. Anim. Sci. 77:723-725.

Dugan, M.E.R., Aalus, J.L., Schaefer, A.L. and Kramer, J.K.G. 1997. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. Can. J. Anim. Sci. 77:1045-1050.

Etherton, T.D., Thompson, E.H. and Allen, C.E.. 1977. Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism. J. Lipid Res. 18:552-557.

- Evans, M. Pariza, M., Park, Y., Curtis, L., Kuebler, B., McIntosh, M. 2000. Trans-10cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor- γ 2 and aP2 expression in 3T3 L1 preadipocyte. *Lipid* 36:1223-1232.
- Folch, J., Lees, M. and Sloan-Stanley, G.N. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226:497-509.
- Fried, S.K. and Zechner, R.. 1989. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis and activity. *J. Lipid Res.* 30:197.
- Green, H. and Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell.* 1:113-116.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., and Pariza, M.W. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.* 8:1881-1887.
- Ip, C., Briggs, S.P., Haeghele, A.D., Thompson, H.J., Storkson, J.M., Scimeca, H.A. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17:1045-1050.
- Ip, C., Scimeca, J.A. and Thompson, H.J. 1994. Conjugated linoleic acid, a powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer.* 74:1050-1054.

- IP, M.M., Masso Welch. P.A., Shoemaker, S.F., Shea-Eaton, W.K. and Ip, C. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. *Exper. Cell. Resea.* 250:22-34.
- James P. Edlany, Fawn Blohm, Alycia A. Truett, Joseph A. Scimeca, and David B. west. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Amer. Physiol. Soci.* R1172-R1179.
- Klaus Eulitz, Martin P. Yurawecz. Najibullah Sehat, Jan Fritsshe, etc. 1999. Preparation, separation, and confirmation of the eight geometrical cis/trans conjugated linoleic acid isomers 8, 10-through 11, 13-18:2. *Lipids.* 34:873-877.
- Kramer, J.K.G., Sehat, N., Dugan, M.E.R., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A.G., Eulitz, K.E., Aalhus, J.L., Schaefer, A.L. and Ku, Y. 1998. Distributions of conjugated linoleic acid(CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLAmixture determined by gas chromatography. *Lipids* 35:549-558.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D. and Pariza, M.W. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 108:19-25.
- Lee, K.N., Ntambi, J.M. and Pariza, M.W. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRSNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:817-821.
- Loffler, G., and Hauner, N. 1987. Adipose tissue development:the role precursor cells and adipogenic factors. *Klin Wochenschr.* 1:65-69.

- Magri, K.A., Adamo, M., Leroith, K. and Etherton, T.D. 1990. The inhibition of insulin action and glucose metabolism by porcine growth hormone in porcine adipocytes is not the results of any decrease in insulin binding or insulin receptor kinase activity. *Biochem. J.* 266:107.
- Martin, D.B., Horning, M.G., and Vagelas, P.R. 1961. Fatty acid synthesis in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 263:663.
- Mersmann, H. J. 1986. Acute effects of metabolic hormones in Swine. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A:48.
- Mougious, V., Matsakas, A., Petridou, A., Ring, S., Sagredos, A., Melissopoulou, A., Tsigilis, N., and Nikolaidis, M. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J Nutr. Biochem.* 12:585-594.
- Muller, H.L., Kirchgessner, M., Roth, F.X. and Stangl, G.I. 2000. Effects of conjugated linoleic acid on energy metabolism in growing-finishing pig. *J. Anim. Physiol. a. Anim Nutr.* 83:85-94.
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevski, D., Scimeca, J.A. and Huth, P.J. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduce plasma lipoproteins and early aortic atherogenesis in hypercholesterolemic hamster. *Artery*, 22:266-277.
- Nilsson-Ehle, P. and Schotz. M.C.. 1976. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.* 17:536.
- Ocha, S. 1955. Malic enzyme. *Methods Enzymol.* 1:735.

- Ohnuiki, K., Haramizu, S., Oki, K., Ishihara, K.K., Tushiki, T. 2001. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice, *Lipids*. 37:583-587.
- Ostrowska, E., Muralitharan, M., Cross, R.F., Bauman, D.E., and Dunshea, F.R. 1999. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J. Nutr.* 129:2037-2042.
- Park, Y., Pariza, M.W. 2001. The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1533:171-174.
- Park, Y.H., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. and Pariza, M.W. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 32:853-858.
- Park, Y.H., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W. and Pariza, M.W.. 1999. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*. 34 : 235-241.
- Peters, J., Park, Y., Gonzalez, F. and Pariza, M. 2001. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice.
- Sakono, M., Miyanaga, F., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fukuda, N., et al. 1990. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids* 34:997-1000.
- Satory, D.L. and Smith, S.B. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits

- proliferation but stimulated lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 129:92-97.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302:93-109.
- Silvia Y. Moya-Camarena, John P. Vanden Heuvel, Steven G. Blanchard, Lisa A. Leesnitzer, and Martha A. Belury. 1999. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *J. Lipid Res.* 40:1426-1433.
- Sisk, M., Azain, M.J., Hausman, D.B., and Jewell, D.E. 1998. Effect of conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague-Dawley and Zucker rats. *FASEB J.* 12:A536.
- Smedman, A., Vessby, B. 2001. Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolic effects. *J. Nutr.* 36:773-781.
- Stangl, G.I., Muller, H., Kirchgessner, M. 1999. Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. *Eur. J. Nutr.* 38:271-277.
- Song M.K., Kennelly J.J. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into ruminants's product. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 16(2):306-314.
- St. John, L.C., Young, C.R., Knabe, D.A., Thompson, L.D., Schelling, G.T., Grundy, S.M. and Smith, S.B. 1987. Fatty acid profiles and

- sensory and carcass traits of tissues from steers and swine fed an elevated monosaturated fat diet. *J. Anim. Sci.* 64:1441-1447.
- Takahashi, Y., Kushiro, M., Schinohara., and Ide, T. 2002. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 133:395-404.
- Thiel, R.L., Parrish, F.C. Jr, Sparks, J.C., Wiegand, B.R. and Ewan, R.C. 2001. Conjugated linoleic acid change swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 79:1821-1828.
- Thiel, R.L., Sparks, J.C., Weigand, B.R., Parrish, F.C., Jr and Ewan, R.C. 1998. Conjugated linoleic acid improves performance and body composition in swine. *J. Anim. Sci.* 76(suppl.2):61(abs).
- Thom, E., Wadstein, J., Gudmundson, O. 2001. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J. Int. Med. Res.* 29:392-396.
- Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Tanemura, K., Kim, H.J., Tange, T., et al. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49:1534-1542.
- West, D., Blohm, F.Y., Truett, A.A., Delany, J.P. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increase total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J. Nutr.* 130:2471-2477.

West, D.B., DeLany, J.P., Camet, P.M., Blohm, F., Truett, A.A., and Scimeca, J. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol. Reg. I.* 44:R667-672.

Whigham, L., Cook, M., and Atkinson, R. 2000. Conjugated linoleic acid: implications for human health.

Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Chrysam, M., Kritchevsky, D. 2000. Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterol hamster. *Nutr. Res.* 20:1795-1805.

Yamamsaki, M., Masho, K., Mishima, H., Kasai, M., Sugano, M., Tachibana, H., and Yamada, K. 1999. Dietary effect of conjugated linoleic acid on lipid levels in white adipose tissue of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 : 1104-1106.

박구부, 문성실, 이정일, 하영래, 주선태. 2001. 식물성유와 동물성유 CLA가 유화형 Sausage의 지방산패도, 육색 및 지방산 조성의 변화에 미치는 영향. *한국축산식품학회지.* 21:71-79.

허선진, 이정일, 하영래, 박구부, 주선태. 2002. Conjugated linoleic acid(CLA)의 생리활성과 축산식품. *동물자원지.* 44:427-442.