

# 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 다클론항체의 생산 및 이용에 관한 연구

백경훈\* · 곽태효\*\* · 오영숙\*\*\* · 최창원\* · 정근기\*\* · 최창본\*\*

농촌진흥청 축산연구소\*, 영남대학교 축산학과\*\*, 영남대학교 생명공학연구소\*\*\*

## Studies on the Development and Utilization of Polyclonal Antibodies Against Swine Adipocyte Plasma Membrane Proteins

K. H. Baek\*, T. H. Kwak\*\*, Y. S. Oh\*\*\*, C. W. Choi\*, K. K. Jung\*\* and C. B. Choi\*\*

National Livestock Research Institute, RDA\*, Department of Animal science, Yeungnam University\*\*, Institute of Biotechnology, Yeungnam University\*\*\*,

### ABSTRACT

The objectives of the current study were to develop polyclonal antibodies in sheep against adipocyte plasma membrane(APM) proteins isolated from swine, to investigate tissue specificity, and to determine cytotoxic effects of antiserum on swine adipocytes. Plasma membrane proteins from adipocyte, brain, heart, kidney, liver, and spleen were isolated using a 32% sucrose gradient. Adult male sheep was immunized three times at three week interval with the purified swine APM proteins. Antiserum was taken from immunized sheep at 10, 12, and 14 days after the third immunization. Antiserum expressed strong reactivity with APM proteins determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and the reactivity could be detected at dilutions in excess of 1 : 81,000. Antiserum showed very low binding affinity with proteins isolated from brain, heart, kidney, liver, or spleen. Tissue specificity of the antiserum was reconfirmed by Western immunoblotting using anti-sheep immunoglobulin G-alkalinephosphatase conjugate as a secondary antibody. The reactivity of antiserum to the external surface of fixed swine adipocytes was confirmed by an immunohistochemical technique using anti-sheep immunoglobulin G-FITC. Confluent swine adipocytes in culture were lysed by antiserum treatment and cytosolic lactate dehydrogenase(LDH) was released as a dose-dependent patterns while adipocytes treated with normal sheep serum maintained their integrity and expressed low level of LDH. These results implicate that fat contents in the pigs can be reduced by immunological methods.

(Key words : Adipocyte, Polyclonal antibody, Cytotoxicity, Lactate dehydrogenase, Pig)

### I. 서 론

2002년 현재 우리나라 국민 일인당 총소득은 1992년과 비교해 약 40% 증가한 10,013 \$로 경제 선진국 반열에 들어서 있다. 이러한 경제

성장과 가장 밀접한 관계에 있는 소위 '먹거리 문화' 또한 채식위주에서 육식위주의 소비형태로 변해, 1인당 육류 소비량의 급격한 증가(1985년, 14.4 kg → 2002년 34.4 kg)를 야기하고 있다. 1인당 육류 소비량의 증가는 결국 1인당

Corresponding author : Chang-Bon Choi, Dept. Animal Science, Yeungnam University, Dae-dong 214-1, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel : 053-810-2932, E-mail : cbchoi@yu.ac.kr

지방 섭취량의 증가로 이어지며, 이에 소비자들은 과다한 지방의 섭취 시 야기될 수 있는 인체의 위해성에 대해 심각한 우려를 나타내고 있다. 따라서 지방 함량이 적은 살코기의 생산에 관한 연구가 매우 절실하지만, 현재까지 소비자와 생산자를 동시에 만족시킬 수 있는 기술은 소개되고 있지 않다.

1990년대부터 영국을 중심으로 면역학적 기법을 이용한 육생산 동물의 체지방 감소에 관한 연구가 활발히 진행되어오고 있다. 이 방법은 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 이용하여 육생산 동물의 지방세포를 직접 파괴 시킴으로써 지방감소 효과를 얻는 것으로서, 많은 학자들이 쥐(Flint, 1998), 토끼(Dulor 등, 1990), 소(Cryer 등, 1984), 면양(Moloney 등, 1998), 돼지(Kestin 등, 1993), 그리고 닭(Butterwith 등, 1992)의 지방세포 원형질막에 대한 항체의 개발과 그 이용성을 보고하였다.

국내에서도 백 등(2000)이 Sprague-Dawley rat의 지방세포 원형질막 단백질을 추출한 뒤, 면양에게 면역주사 하여 생산한 다클론 항체가 지방세포 특이적인 반응을 나타냄을 ELISA와 Western immunoblot 분석을 통해 확인하였으며, 면역형광염색법을 통해 항원 단백질인 지방세포 원형질막 단백질과 생산한 다클론 항체가 강하게 결합함을 보고하였다. 또한 실제 배양 중인 rat adipocyte에 다클론 항체를 처리하였을 경우 세포독성(cytotoxicity) 효과가 있는 것으로 동일한 연구에서 보고하였다.

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 이용한 *in vivo* 세포독성 시험에서는 항체원액을 동결건조하여 제조한 동결건조항체(lyophilized antiserum)를 복강주사하여 피하지방(21.9%)과 신지방+장간막지방+정소외막지방조직(36.0%)을 유의적으로 감소시켰다(백 등, 2002).

이러한 면역학적 방법에 대한 확실한 mechanism은 아직 규명되고 있지 않지만, 아마도 지방세포의 가장 큰 특징인 triacylglycerol을 저장하는데 있어서 각종 지방대사 관련 호르몬 수용체에 항체가 작용함으로써 직접 지방세포에 세포독성을 나타내기 때문이라는 이론이 가장 지배적이다(Nassar와 Hu, 1991a Kestin 등, 1993).

이와 아울러 Dulor 등(1990)은 토끼를 이용한 실험에서 항체가 지방조직 내 lipoprotein lipase(LPL)의 활성도를 현저히 떨어뜨리기 때문이라고 하였으며, 나아가서 항체를 처리한 지방세포는 tumor-necrosis factor(TNF)를 생산하고 이 TNF가 LPL의 활성도를 떨어뜨리기 때문이라고 하였다. 한편 Moloney(1990)는 항체를 처리한 면양은 인슐린 저항상태(insulin-resistant state)에 빠져들어 결국은 지방조직 내 지방이 축적되지 못한다고 하였다.

따라서, 본 연구는 실제 육생산 동물인 돼지로부터 분리한 지방세포 원형질막 단백질에 대한 다클론 항체를 면양에서 생산한 후, 다클론 항체의 역가(titer)와 함께 주요 장기와의 교차반응성(cross-reactivity)을 확인하고, 배양된 돼지 지방세포를 이용하여 항체의 *in vitro* 세포독성을 검증함과 아울러 항체의 실용적 이용성을 검토하고자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 항혈청의 생산

돼지 지방세포 및 주요 장기(뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장)의 원형질막 단백질을 분리한 최 등(1998)이 돼지 원형질막 단백질을 분리한 방법과 동일한 방법으로 추출해 내었으며, 항혈청 생산을 위해 성숙한 수컷 면양의 피하부위(목 뒷부분과 양쪽 서혜부)에 돼지로부터 추출한 지방세포 원형질막 단백질(250 ug/ml)을 Freund's complete adjuvant 및 Freund's incomplete adjuvant와 섞은 후 3회 면역주사(3주 간격)하였다.

채혈은 경정맥에서 실시하였고, 최초의 면역주사 전 normal sheep serum(비 면역혈청)을 채취하였으며, 마지막 면역주사가 끝난 후 12일 경과 후 antiserum(항혈청)을 채취하였다.

받은 혈액들은 실온에서 1시간 정지시켜 굳게 만들었으며, 20 °C, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리해 antiserum을 생산하였고, 분리한 antiserum은 여러 실험에 사용하기 전까지 -80 °C에서 냉동보관 하였다.

## 2. Antiserum의 역가(titer)와 교차반응성(Cross-reactivity)

면양에서 추출한 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 antiserum의 역가 및 주요장기와의 교차반응성 등은 Flint 등(1986)과 Killefer와 Hu(1990)가 제시한 ELISA 방법으로 측정하였으며, 실험 design 및 antiserum의 희석배율, antigen coating 농도, secondary antibody의 선택 및 그와 관련된 substrate의 종류, washing buffer의 종류 등은 모두 백 등(2000)의 방법과 같다.

## 3. Western immunoblotting을 이용한 항체의 조직특이성 확인

Western immunoblotting으로 antiserum의 조직 특이성을 확인하기 위하여 먼저 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였으며 그 후 nitrocellulose membrane으로의 transfer 과정 및 Western immunoblot 방법(실험 design, primary antibody 및 secondary antibody의 희석배율, secondary antibody의 종류와 substrate의 종류 등)은 백 등(2000)이 제시한 방법과 동일하다.

## 4. 면역조직화학을 통한 항체의 특이성 확인

돼지 지방세포 원형질막에 대해 면양으로부터 생산한 antiserum이 가지는 지방세포 원형질막과 실제 결합하는 것을 육안으로 확인하기 위하여 immunohistochemistry를 실시하였다.

지방조직을 10% neutral buffer formalin(30 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 54.6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 37~40% formalin)에 넣어 4°C에서 24시간 이상 고정시킨 후, 고정된 지방조직을 tissue capsule에 넣어 흐르는 물에서 12시간 동안 washing 하였다.

Washing 후 지방 조직을 탈수시켰는데 조직의 충격을 줄이기 위해 70% → 80% → 90% → 100% alcohol로 옮기면서 각각 1시간씩 두었다. 탈수 후 xylene 용액에 1시간씩 2회 침지하고 paraffin과 xylene을 1:1로 혼합한 용액에

다시 1시간 더 침지하였다. 지방조직을 paraffin-1, paraffin-2, paraffin-3에 각각 1시간씩 넣어 뚫으로써 paraffin 침투과정을 거친 후, stainless mold에 올려놓고 paraffin을 넣어 embedding 하였다.

Embedding된 지방조직을 상온에서 12시간 이상 천천히 굳게 한 다음 4°C에 보관하여 cutting을 쉽게 하기 위해 조직을 다듬었다. Microtome (Microm, Heidelberg, Germany)을 이용하여 10  $\mu\text{m}$ 의 두께로 cutting한 지방조직을 물기가 있는 슬라이드 글라스 위에 올린 후, 상온에서 24시간 이상 건조시켰다. 건조된 슬라이드 글라스를 xylene에 5분간 넣은 후, 100% → 90% → 70% alcohol에 각각 5분씩 넣어 조직이 다시 수분을 흡수하도록 하고 마지막 단계 후에는 증류수에 넣어 슬라이드 글라스가 마르지 않도록 하였다.

지방 조직을 5% skim milk/TBS(50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7.2) 용액에 30분간 넣어 뚫으로써 항체의 비특이적 결합을 방지하였고, 돼지 지방세포 원형질막 단백질을 면양에게 면역주사하여 생산한 antiserum을 primary antibody로 TBS와 1:100으로 희석하여 지방조직 위에 100  $\mu\text{l}$ 씩 점적한 후 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 PBS(0.76 M NaCl, 0.3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2)에 5분간, 3회 반복하여 세척하였다.

Secondary antibody로는 PBS에 1:500으로 희석한 anti-sheep immunoglobulin-fluorescein isothiocyanate(FITC) conjugate(Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo, USA)를 이용하였으며, primary antibody와 반응한 지방조직 위에 100  $\mu\text{l}$ 씩 처리하여 어두운 곳에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직을 PBS로 5분간 3회 세척하고 50% glycerol을 30  $\mu\text{l}$ 씩 추가 점적하여 커버 글라스를 덮은 후 형광현미경으로 관찰하였다. Primary antibody 처리시 antiserum 대신 normal sheep serum으로 반응시킨 지방조직을 대조구로 이용하였다.

## 5. Antiserum의 세포 독성 효과

### (1) 형태학적 변화

도축장에서 도살된 돼지로부터 신장주위 지

방조직을 적출한 후, 39 °C로 보온된 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)에 보관하여 실험실로 운반하였다. Digestion medium[Collagenase (1 mg/ml buffer, Sigma Chemical Co.) Bovine Serum Albumin(BSA) 1.6 g Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; GIBCO™, Paisley, PA49RF, Scotland, U.K.)] 40 ml를 응고되지 않은 지방조직에 첨가한 후 water shaking incubator(KMC-1205SW2, Vision Scientific Co., 부천, 대한민국)를 이용하여 40 °C에서 90분 동안 150 strokes로 digestion 하고 nylon mesh(250 μm)를 이용해 여과시킴으로써 digestion 되지 않은 지방조직을 제거하였다. 여과된 용액내의 성숙 지방세포(mature adipocytes)를 함유하는 상층의 지방층을 제거한 후, 미성숙 지방세포(immature pre-adipocytes)를 함유한 하층을 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 pellet을 얻고 이를 DMEM으로 3회 세척하여 지방 전구세포(pre-adipocytes)를 포함한 세포군을 얻었다.

Cell counting을 통해 세포 수를 계산한 다음,  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>의 농도로 6-well plate와 T-25 bottle에 나누어 분주한 뒤, growth media(DMEM with 5 % Fetal bovine serum(FBS; GIBCO™) penicillin 100 U/ml streptomycin 100 μl/ml)로 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

6-well plate에 배양한 돼지 지방세포가 confluent 상태가 되면 10배 희석한 normal sheep serum과 antiserum을 각각 50 μl씩 처리해 주었으며, 30분 경과 후 추가로 각 well에 100배 희석한 보체(Complement; S-1639, Sigma Chemical Co.)를 50 μl씩 주입한 뒤, 약 30분이 경과한 후 일어나는 형태학적인 변화를 광학 현미경으로 관찰하였다.

## (2) LDH assay

배양 중인 돼지 지방 세포에 antiserum을 처리한 뒤 배양액 내 유리되는 세포질 내 표지효소인 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성도를 측정함으로써(Flint 등, 1986) 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 antiserum의 세포독성 효과를 검증하였다.

앞에서 설명한 방법으로 T-25 bottle에 배양한

돼지 지방 전구 세포를 96-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주한 뒤 지방세포가 confluent 상태가 되면 serum free medium으로 갈아준 후, PBS에 1:10으로 희석한 antiserum을 50 μl씩 첨가 후, 30분 동안 incubator에서 배양시켰다.

항원-항체 반응 후, 보체를 PBS에 1:10으로 희석하여 50 μl씩 넣고 다시 30분간 더 배양시켰다. 배양 후, 96-well plate를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 파괴된 지방세포에서 유리된 cytosolic enzymes이 있는 상층액 20 μl씩을 취하여 다른 96-well plate에 옮겼다. 4 mg의 3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide(MTT), 8 ml의 0.2M Tris-HCl(pH 8.2), 2 ml의 β-Nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), 20 μl의 Triton X-100, 2.5 mg의 diaphorase와 0.5 ml의 10mM lactate substrate가 혼합된 assay mixture를 각 well에 200 μl씩 첨가한 뒤 암실에서 30분 동안 발색 반응을 시킨 후, microplate reader로 595 nm에서의 O.D.값을 측정하였다.

## (3) MTT assay

96-well plate에 subculture한 지방 전구 세포( $2 \times 10^5$  cell/well)에 LDH assay와 동일한 방식으로 항체를 처리한 후, 배지를 제거하였다. 배지가 제거된 well에 serum free 배지(180 μl/well)를 넣고 MTT assay mixture(5 mg/ml in PBS, 4 °C)를 20 μl 첨가하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 3~4시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 active cell이 crystalized 된 것을 확인하고 다시 배지를 제거하였다. 제거되지 않은 배지는 배양기 내에서 건조시킨 후, 100 % DMSO(Dimethyl Sulfoxide)와 ethanol을 1:1로 혼합한 용액을 well당 200 μl씩 첨가하여 crystalized 된 결정이 완전히 용해될 때까지 약 20분간 shaking 하였다. 결정이 용해되면서 변화한 각 well의 발색 정도를 microplate reader(540 nm)로 측정하였다.

## 6. 통계처리

처리구간(normal sheep serum과 antiserum 처

리구)과 항체 희석 배율이 지방세포에 대한 반응성에 미치는 영향과 상호작용 효과의 여부를 알아보기 위하여 아래와 같은 상호작용 효과가 있는 이원 분산분석 모형을 가정하고 분석하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$(i = 1, 2; j = 1, 2, 3, 4; k = 1, 2, 3, 4)$$

여기에서  $\mu$ 는 전체평균,  $\alpha_i$ 는  $i$ 번째 처리구간의 효과,  $\beta_j$ 는  $j$ 번째 희석배율에 따른 효과,  $(\alpha\beta)_{ij}$ 는  $i$  처리구와  $j$  희석배율간의 상호작용,  $Y_{ijk}$ 는 관측된 흡광도를 나타내며,  $\varepsilon_{ijk}$ 는 각각의 실험에서의 오차를 나타낸다.

자료에 대한 분석은 통계패키지인 SPSS (Release 12.0.0 copy-right 1989 - 2003 © SPSS Inc., Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor, Chicago, Illinois 60606)에 포함된 일반선형모형(General linear model)의 일변량 분석기법을 이용하였다.

항체의 처리로 인해 발색하는 흡광도가 주요 장기에 따라 차이가 나는지와 동일한 장기라도 항체 희석배율에 따라 어떠한 차이가 나타나는지, 그리고 상호작용 효과가 있는지를 알아보기 위한 실험자료의 분석도 위에서 사용한 통계모형을 가정하고 분석하였다.

배양중인 돼지 지방세포에 대한 antiserum의 세포독성 효과에 대한 분석은 SPSS의 T-TEST를 이용하여 검정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Antiserum의 역가와 교차 반응성

돼지 지방세포로부터 추출한 원형질막 단백질을 면양에 면역주사 하여 얻은 antiserum이 돼지 지방세포에 대해 가지는 역가를 ELISA로 측정된 결과는 Fig. 1과 같으며, antiserum의 역가가 가장 높게 나타난 3,000배 희석 배율에서의 흡광도를 100%로 했을 때, normal sheep serum 및 antiserum의 희석 배율에 따른 상대적 흡광도로 표기한 것이다.

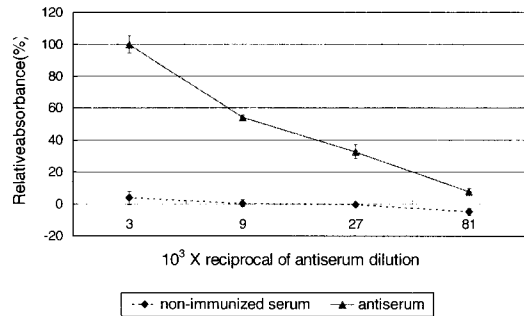


Fig. 1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of normal sheep serum and antiserum raised in sheep against adipocyte plasma membrane (APM) proteins isolated from pigs. The reactivity was expressed as a percentage of the maximum optical density of antiserum bled at 12 days after the third immunization (1:3,000). Optical density was determined at 405nm using microplate reader. n = 4.

희석배율과 처리에 따른 이원분산분석을 실시해본 결과, 항원 - 항체 반응으로 나타난 흡광도는 희석배율에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며 (P - 값 = 0.000), 처리에 따른 유의적인 차이도 나타내었다 (P - 값 = 0.000). 또한, 희석배율과 처리간의 상호작용도 유의적인 것으로 나타났다 (P - 값 = 0.000). 그리고 다중비교검정 (Tukey 검정,  $\alpha = 0.05$ )에서 희석배율에 따라 동일집단군으로 간주 할 수 있는 희석배율군은 나타나지 않았다.

Fig. 1에서 알 수 있듯이 동일한 면양으로부터 면역주사 전에 얻어진 normal sheep serum은 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대하여 항원 - 항체 반응을 거의 나타내지 않았으나 지방세포 원형질막 단백질을 항원으로 면역주사 하여 생산된 antiserum은 높은 항원 - 항체 반응을 나타내어 항체 희석 배율이 1:81,000 이상에서도 그 반응이 감지되었다. 이는 백 등 (2000)이 보고한 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체가 가지는 역가와 유사한 패턴을 나타내고 있으며, 이러한 사실로 미뤄볼 때 본 연구에서 면양 체내에 주입된 항원에 대한 항원 특이 항

체의 생산이 원활하게 이루어 졌다고 생각할 수 있다.

Flint 등(1986)은 흰쥐의 지방세포 원형질막 단백질을 면양에 면역 주사한 결과 27,000배의 희석배율에서도 역가를 측정할 수 있었으며, Moloney 등(1998)은 면양의 원형질막 단백질에 대한 항체를 생산하였고, Nassar와 Hu(1991b)는 normal sheep serum과 비교하여 면양의 원형질막 단백질에 대한 antiserum의 높은 역가를 보고하였다.

Fig. 2는 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 antiserum의 조직 특이성을 조사한 결과를 나타낸 것으로, 역시 전술한 ELISA 방법을 통해 주요 장기(뇌, 심장, 신장, 간장, 비장)들과 지방세포를 항원으로 이용하여 교차반응성(cross-reactivity)을 측정한 결과이다.

희석배율과 처리에 따른 이원분산분석을 실시해본 결과, 역가 실험결과와 마찬가지로, 항원 - 항체 반응으로 나타난 흡광도는 희석배율에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며(P - 값 = 0.000), 처리에 따른 유의적인 차이도 나타났으며(P - 값 = 0.000), 희석배율과 처리간의 상호작용도

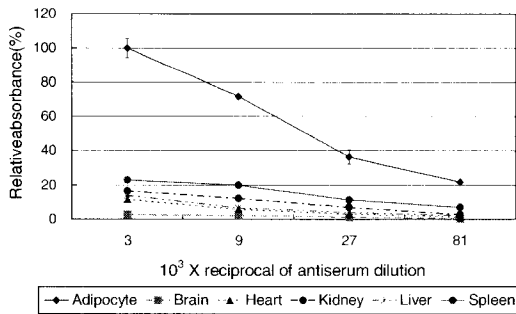


Fig. 2. Cross-reactivity of antiserum with plasma membrane proteins isolated from the adipose tissue, brain, heart, kidney, liver, and spleen of pigs. The relative reactivity was expressed as a percentage of the maximum optical density of antiserum against adipocyte plasma membrane proteins bled at 12 days after the third immunization(1:3,000). Optical density was determined at 405 nm using microplate reader. n = 4.

유의적으로 나타났다(P - 값 = 0.000). 또한 다중 비교검정(Tukey 검정,  $\alpha = 0.05$ )에서 희석배율에 따라 동일집단군으로 간주 할 수 있는 희석배율군은 나타나지 않았다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 antiserum은 다른 조직으로부터 추출한 원형질막 단백질에 대해서는 거의 항원 - 항체 반응을 나타내지 않았지만, 역가 측정에서도 확인한 바와 같이, 지방세포 원형질막 단백질과는 특이적으로 매우 강한 반응을 나타내었다. 주요 장기 중 1:3,000의 배율로 희석된 antiserum은 지방세포를 제외하고 비장의 원형질막 단백질과 가장 높은 교차반응성을 나타내었는데, 이와 같이 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 antiserum이 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장 조직의 원형질막 단백질과도 미약하지만 교차반응을 한다는 점으로 미루어, 지방세포 원형질막과 이들 조직의 원형질막에 공통으로 존재하는 단백질이 있을 것이라 예상된다.

## 2. Western immunoblotting을 이용한 항체의 조직특이성 확인

Fig. 3은 antiserum과 antigen(지방세포를 비롯한 주요 장기의원형질막 단백질들)간의 반응을 나타낸 Western immunoblotting의 결과이다.

본 연구에서 생산한 antiserum은 지방세포 원형질막 단백질과 특이적으로 결합하는 반면, 다른 조직인 심장, 신장, 간장, 근육, 그리고 비장으로부터 추출한 원형질막 단백질들과는 상대적으로 매우 미약한 반응을 나타내고 있다. 백 등(2000)은 Western immunoblotting을 통해 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체는 지방세포 원형질막 단백질과 특이적으로 결합하며, 다른 조직(심장, 신장, 간장, 근육 및 비장)들과 교차반응은 매우 미비하게 나타난다고 보고하여 본 연구의 결과와 일치한다.

이러한 Western immunoblotting 결과는 ELISA에서 확인된 지방세포 원형질막에 대한 항체의 조직 특이성 결과와 일치하는 것이며, Kestin

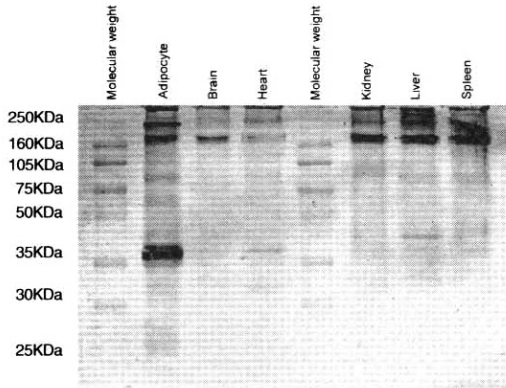


Fig. 3. Western immunoblotting results using proteins isolated from various organs of pigs as an antigens and antiserum raised in sheep against adipocyte plasma membrane(APM) proteins of pigs as a primary antibody. Equivalent amount (10  $\mu$ g) of membrane proteins isolated from adipocyte, brain, heart, kidney, liver, and spleen were loaded at each lane. Anti-sheep immunoglobulin G-alkaline phosphatase conjugate was used as a secondary antibody.

등(1993)이 돼지의 지방세포 원형질막 전체 단백질을 면양에 면역 주사하여 얻은 antiserum을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과와 매우 유사한 항원-항체 반응 band pattern을 나타내고 있다. Nassar와 Hu(1991b) 또한 면양의 지방세포에 대한 항체를 지방, 간장, 신장, 심장 및 적혈구 세포의 원형질막 단백질과 Western immunoblotting을 실시하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었는데, 이러한 미약한 교차반응은 각각의 종(species), 품종(breed), 그리고 조직(tissues)에 따라 각기 특이적인 단백질이 다량 존재하기 때문이라고 설명하였다.

### 3. Immunohistochemistry

Fig. 4는 anti-sheep immunoglobulin G-FITC를 사용하여 돼지 지방세포의 원형질막 외부표면에 본 연구에서 생산한 항체가 직접 결합하는 것을 형광 현미경으로 관찰한 면역조직화학기법의 결과이다.

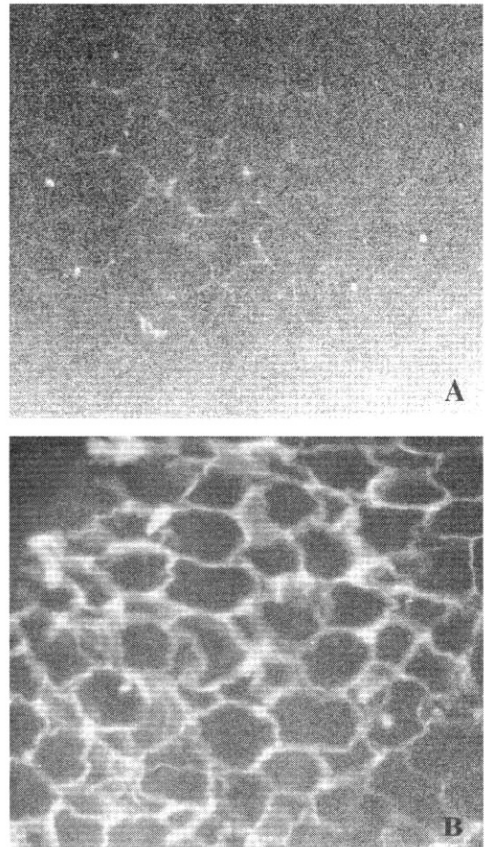


Fig. 4. Immunofluorescence stained of pig adipose tissue with antiserum raised in sheep against adipocyte plasma membrane(APM) proteins of pig. Adipose tissues were fixed in formalin and incubated with normal sheep serum(A) and with antiserum(B) at dilution of 1:100. Anti-sheep immunoglobulin G-FITC was used as a secondary antibody at dilution of 1 : 500. 400x.

돼지 지방세포 원형질막에 대한 antiserum은 normal sheep serum을 처리한 조직에서는 관찰할 수 없었던 강한 형광을 나타냄으로써 돼지 지방세포의 외부 표면에 강하게 결합하고 있음을 육안으로 확인할 수 있었으며, 이는 Killefer와 Hu(1990)가 돼지 지방세포 원형질막 단백질에 대한 단클론 항체를 이용한 실험에서 나타난 결과와 동일한 결과이다. Killefer와 Hu(1990)는 일반적으로 지방세포 원형질막에는

intrinsic, integral, 및 extrinsic 단백질이 존재하는데, 항원-항체 반응을 나타내는 단백질이 이들 단백질 중 어떤 단백질인지에 대해서는 현재까지의 연구의 결과만으로 알 수 없고, 이에 대해서는 보다 상세한 연구가 필요하다고 하여 보다 구체적이고 세밀한 추가 연구의 필요성을 언급했다. Normal sheep serum을 처리한 지방세포에 나타나는 약간의 형광은 배경 형광인 것으로 생각된다.

#### 4. Antiserum의 세포 독성 효과

Fig. 5는 본 연구에서 생산한 antiserum을 배양 중인 돼지 지방세포에 처리했을 때의 형태학적인 변화를 나타낸 것이다.

Confluent 상태의 돼지 지방세포는 normal sheep serum을 처리한 대조구와는 달리 antiserum의 처리로 인해 lysis되고 있음을 광학현

미경으로 확인할 수 있다.

Flint 등(1986)과 Kestin 등(1993)은 각각 쥐와 돼지의 지방세포 원형질막 단백질에 대해 생산한 antiserum을 쥐와 돼지에 수동 면역시킨 후 지방조직의 조직학적 변화를 관찰한 결과, 항체의 작용으로 인해 지방세포가 파괴된 것을 확인하였다고 보고하였다. 본 연구의 결과로 제시된 배양중인 돼지 지방세포에 대한 antiserum의 *in vitro* 세포독성 결과는, 향후 *in vivo* 세포독성 검증을 위한 돼지 생체시험에 있어 매우 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

Fig. 6은 배양중인 돼지 지방세포에 normal sheep serum과 antiserum을 처리하였을 때, 항체의 작용으로 파괴된 돼지 지방세포로부터 유리되는 cytosolic LDH의 양을 상대적인 활성도로 나타내고 있다.

Antiserum을 처리한 처리구에서는 normal sheep

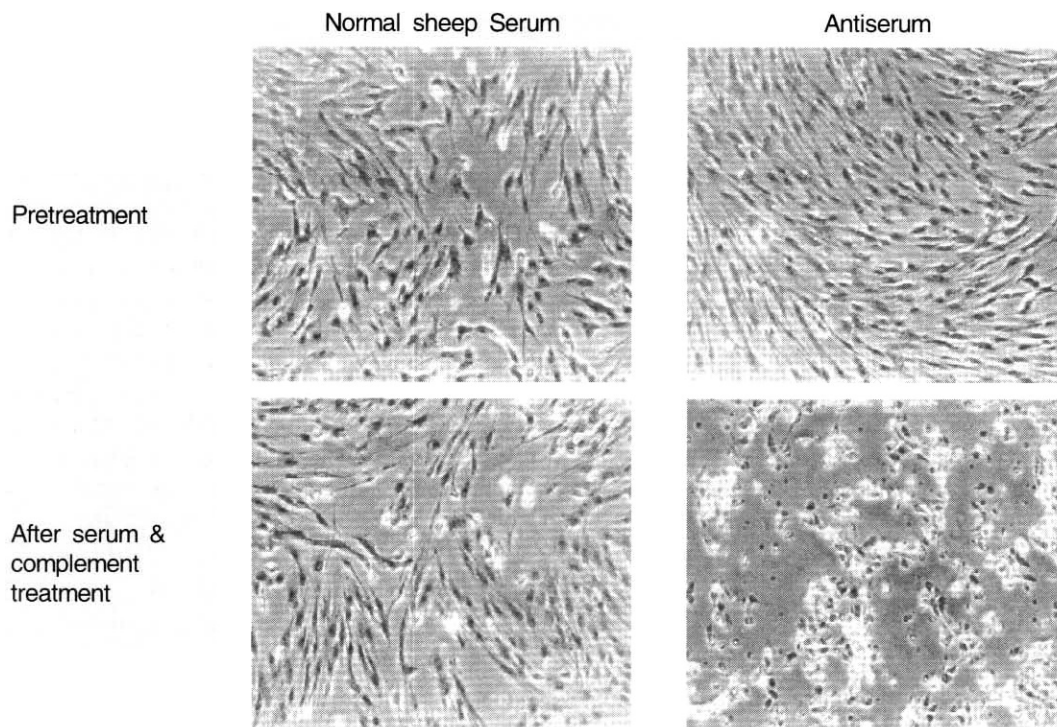


Fig. 5. Morphological changes of pig adipocytes after treatment either with normal sheep serum or with antiserum. After the cells were reached at confluent,  $50\mu\text{l}$  of diluted(10 x) normal sheep serum or antiserum was added into appropriate wells. Thirty min after serum treatment,  $50\mu\text{l}$  of complement was added onto cells and morphological changes were examined under microscope. 100 x.



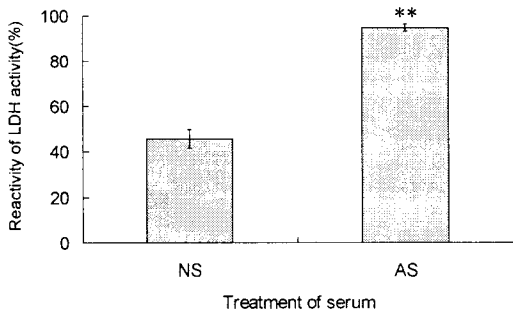


Fig. 6. Lactate dehydrogenase(LDH) activity released from confluent pig adipocytes by antiserum treatment. Relative activity was calculated as a percentage of the maximum optical density of anti-serum treated group. NS = Normal sheep serum, AS = Antiserum. Means  $\pm$  SE(n = 4). Values with different superscripts are different(P < .01).

serum을 처리한 대조구와 비교해 현저하게 많은 양의 cytosolic LDH가 방출되었음을 확인할 수 있었다(P < .01). 이와 같이 배양액 내 세포질 내 표지효소인 LDH의 방출량이 항체 처리 후 대조구 보다 유의적으로 증가하였다는 사실은, 본 연구에서 생산한 antiserum이 가지는 강한 세포독성을 간접적으로 증명하는 자료로 보여진다. Fig. 6의 normal sheep serum 처리에 의한 약간의 LDH 방출은 보체 (complement)계의 활성화에 의한 지방세포의 파괴로 볼 수 있다.

배양중인 돼지 지방세포에 대한 항체의 효과를 검증하기 위해 LDH assay와 함께 MTT assay 또한 수행하였다. MTT assay는 항체 처리 후에도 살아 있는 세포들에 의해 노란색의 tetrazolium salt MTT가 보라색의 formazan crystal로 분열되는 원리를 이용한 것으로 Fig. 7에 나타난 바와 같이 normal sheep serum과 비교해서 antiserum의 처리에 의해 돼지의 지방세포가 현저히 파괴되었음을 확인할 수 있다(P < .05). 이는 본 연구에서 생산한 antiserum이 돼지의 지방세포에 매우 강한 세포독성을 지니고 있음을 나타내는 결과이며, LDH assay의 결과와 동일한 것이다.

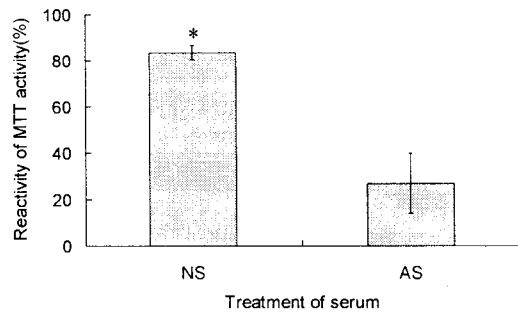


Fig. 7. MTT activity measured in confluent pig-adipocytes treated with either normal sheep serum(NS) or antiserum(AS). Relative activities were expressed as percentage of the maximum optical density of NS treated group. Mean  $\pm$  SE(n = 4). Values with different superscripts are different(P < .05).

Flint 등(1986)은 쥐의 지방세포 원형질막에 대한 면양의 antiserum을 지방세포에 처리한 결과 cytosolic LDH의 방출을 유의하게 증가시키고, 궁극적으로는 세포의 파괴를 초래하였다고 보고하였다. Pantou 등(1990)도 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 면양의 antiserum은 지방세포에 강한 세포 독성을 나타낸다는 것을 LDH assay로 확인하였다. 본 연구의 결과로 나타난 antiserum의 세포독성 결과들은 이들 보고들과 일치하며, 이는 전술한 지방세포의 형태학적인 변화와 함께 본 연구에서 개발한 항체를 돼지의 수동면역 시킬 경우, 체지방을 감소시킬 수 있다는 가능성을 시사한다.

#### IV. 요약

본 연구는 돼지 지방세포 원형질막 단백질을 면양에게 수동면역 주사하여 생산한 다클론항체의 조직특이성을 확인하고, 돼지 지방세포에 대한 세포 독성효과를 검증하기 위해 실시되었다. 지방세포, 뇌, 심장, 신장, 간장 및 비장의 원형질막 단백질을 32% sucrose gradient를 이용해 분리하였으며, 지방세포 원형질막 단백질을 성숙한 수컷 면양에 3주 간격으로 3회 면역 주사 한 뒤, 마지막 면역주사 이후 10일, 12일 및 14일에 혈액을 채취하여 항혈청을 생산하였

다. ELISA 분석 결과, 생산한 항혈청은 지방세포 원형질막 단백질에 대해 81,000배의 희석배율에서도 감지될 수 있을 만큼 강한 반응을 나타내었으나, 기타 주요장기(뇌, 심장, 신장, 간장, 및 비장)와는 미약한 반응을 나타내었다. 이러한 항혈청의 조직특이성은 anti-sheep immunoglobulin G-alkaline phosphatase를 secondary antibody로 사용한 Western immunoblot 분석에서도 재확인 할 수 있었다. Anti-sheep immunoglobulin G-FITC를 이용한 면역조직화학기법의 결과로 본 연구에서 생산한 항혈청이 돼지 지방세포 원형질막 표면에 강하게 결합하고 있음을 확인할 수 있었으며, 실제 배양중인 돼지 지방세포에 항혈청을 처리한 결과, 세포질 내 표지 효소인 lactate dehydrogenase(LDH)가 현저하게 증가한 반면 normal sheep serum을 처리한 지방세포에서는 LDH의 방출이 상대적으로 낮게 나타나, 본 연구에서 생산한 항혈청의 강한 *in vitro* 세포독성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 면역학적 기법을 이용해 돼지의 체지방 함량을 감소시킬 수 있다는 가능성을 나타내는 것으로 생각된다.

## V. 인 용 문 헌

- Butterwith, S. C., Kestin, S., Griffin, H. D., Beattie, J. and Flint, D. J. 1992. Identification of chicken(*Gallus domesticus*) adipocyte plasma membrane and differentiation specific proteins using SDS-PAGE and western blotting. *Comp. Biochem. Physiol.(B)* 101:147-151.
- Cryer, A., Gray, B. R. and Woodhead, J. S. 1984. studies on the characterisation of bovine adipocyte precursor cells and their differentiation *in vitro*, using an indirect-labelled-second-antibody cellular immunoassay. *J. Devl. Physiol.* 6:159-176.
- Dulor, J. P., Reyne, Y. and Nougues, J. 1990. *In vivo* effects of a treatment with antibodies to adipocyte plasma membranes in the rabbit. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:49-58.
- Flint, D. J. 1998. Effects of antibodies to adipocytes on body weight, food intake, and adipose tissue cellularity in obese rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252:263-268.
- Flint, D. J., Coggrave, H., Futter, C. E., Gardner, M. J. and Clarke, T. J. 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.
- Kestin, S., Kenndy, R., Tonner, E., Kiemam, M., Cryer, A., Griffin, H., Butterwith, S., Rhind, S. and Flint, D. J. 1993. Decreased fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* 71:1486-1494.
- Killefer, J. and Hu, C. Y. 1990. Production of a novel monoclonal antibody to porcine adipocyte plasma membrane. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 194: 172-176.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Moloney, A. P., Allen, P. and Enright, W. J. 1998. Passive immunisation of sheep against adipose tissue : Effects on metabolism, growth and body composition. *Livest. Prod. Sci.* 56:233-244.
- Moloney, A. P. 1990. Immunizing against adipose plasma membranes to reduce body fat: effects on plasma metabolites and insulin. *Biochem. Soc. Trans.* 18:336-337.
- Nassar, A. H. and Hu, C. Y. 1991a. Growth and carcass characteristics of lambs passively immunized with antibodies developed against ovine adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* 69:578-586.
- Nassar, A. H. and Hu, C. Y. 1991b. Antibodies to ovine adipocyte plasma membranes recognize tissue and species specific plasma membrane components. *Comp. Biochem. Physiol.* 98(2/3):361-367.
- Panton, D., Futter, C., Kestin, S. and Flint, D. J. 1990. Increased growth and protein deposition in rats treated with antibodies to adipocytes. *Am. J. Physiol.* 258:E985-989.
- 백경훈, 권은진, 곽태효, 정근기, 최창본. 2000. 흰쥐 지방세포 원형질막에 대한 다클론 항체의 *in vitro* 세포독성 효과. *한국동물자원과학회지.* 42:261-268.
- 백경훈, 최창본. 2002. 지방세포 원형질막 단백질에 대한 다클론 항체의 수동면역이 수컷 흰쥐의 체조성에 미치는 영향. *한국동물자원과학회지.* 44:39-44.
- 최창본, 이명진, 권은진. 1998. 면양을 이용한 돼지 지방세포 원형질막 단백질 특이 항체의 생산. *대한생명과학회지.* 4:57-63.

(접수일자 : 2004. 10. 22. / 채택일자 : 2005. 2. 15.)